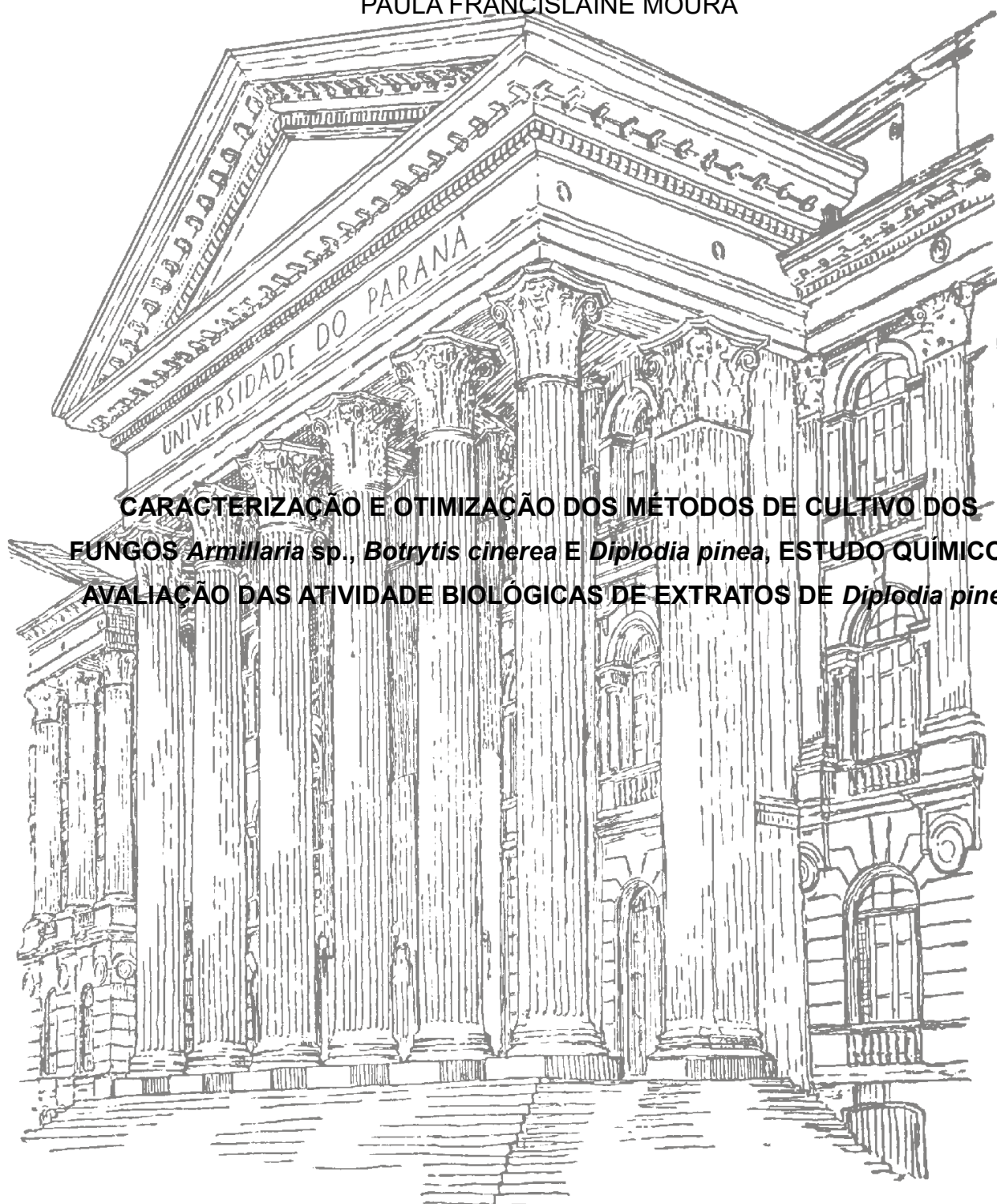


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA FRANCISLAINE MOURA



**CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE CULTIVO DOS
FUNGOS *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* E *Diplodia pinea*, ESTUDO QUÍMICO E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADE BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE *Diplodia pinea***

CURITIBA
2017

PAULA FRANCISLAINE MOURA

**CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DOS MÉTODOS DE CULTIVO DOS
FUNGOS *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* E *Diplodia pinea*, ESTUDO QUÍMICO E
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADE BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE *Diplodia pinea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marilis Dallarmi Miguel.

Co-Orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer.

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Cristiane da Silva Paula de Oliveira.

CURITIBA
2017

Moura, Paula Francislaine

Caracterização e otimização dos métodos de cultivo dos fungos *Armillaria sp.*, *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*, estudo químico e avaliação das atividades biológicas de extratos de *Diplodia pinea* / Paula Francislaine Moura – Curitiba, 2017. 149 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientador: Professor Dr. Celso Garcia Auer

Coorientadora: Professora Dra. Cristiane da Silva Paula de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Pinus*. 2. *Armillaria*. 3. Gravimetria. 4. Cromatografia líquida. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Auer, Celso Garcia. III. Oliveira, Cristiane da Silva Paula de. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título

CDD 615.1901




TERMO DE APROVAÇÃO


PAULA FRANCISLAINE MOURA

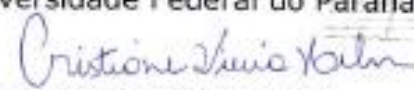
Título: "Caracterização e otimização dos métodos de cultivo dos fungos *Armillaria sp.*, *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*, estudo químico e avaliação das atividades biológicas de extratos de *Diplodia pinea*"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Marilis Dallarmi Miguel
Orientadora


Dr. Celso Garcia Auer
Co-orientador


Prof. Dr. Sandra Maria Warumby Zanin
Universidade Federal do Paraná


Dr. Cristiane Vieira Helm
Embrapa Florestas

Curitiba, 20 de fevereiro de 2017.

Dedico aos meus pais Maria de Lourdes Moura e Hélio Moura pelo apoio constante e por não pouparem esforços para a realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado a vida, por estar comigo todos os dias e por me amparar a cada queda.

Aos meus pais, Maria de Lourdes Moura e Hélio Moura, os amores da minha vida, pelo apoio, por secarem tantas vezes minhas lágrimas, por se anularem para que eu pudesse realizar meus objetivos, por nunca desistirem de mim, não pouparem esforços e me amarem tanto.

À minha irmã Luanna Moura (*in memoriam*), anjo que passou pela minha vida e que mesmo tão pequenina me ensinou o significado de amor verdadeiro e fortaleza.

À minha irmã Angélica Ponce Moura e meus sobrinhos Vinícius e Eduardo, por trazerem felicidade para a minha vida.

À Katlin Suellen Rech e a Camila Freitas de Oliveira, amigas, irmãs e anjos que entraram na minha vida, por nunca me deixarem desistir, me ensinarem tantas coisas, me fazerem crescer como pesquisadora, me fazerem sorrir e secarem as minhas lágrimas.

Ao querido amigo Fernando César Betim pelas risadas e amizade, querida amiga Angela Maria de Souza pelos momentos de felicidade, amizade, ensinamentos e ajuda com toda a parte de microbiologia e sinergismo fúngico.

À querida Pós doutoranda Beatriz Cristina Konopatzki Hirota, pela amizade, correções e contribuição científica.

Aos meus queridos amigos por sempre me ouvirem e me apoiarem nos momentos difíceis da minha vida.

À minha querida orientadora a quem tenho profunda admiração, Professora Dra^a Marilis Dallarmi Miguel, pela oportunidade, ensinamentos, confiança e profunda amizade. A senhora representa um grande porto seguro a quem sei que sempre posso recorrer.

Ao meu co-orientador Professor Dr^o Celso Garcia Auer pela oportunidade, confiança e importantíssima orientação.

À minha querida co-orientadora Prof^a Dr^a Cristiane da Silva Paula de Oliveira, pela amizade, momentos de descontração, contribuição científica, correções e oportunidade no estágio de docência.

Ao querido Professor Drº Obdúlio Gomes Miguel pela amizade inúmeros ensinamentos que contribuíram muito para o meu conhecimento e formação.

Às Professoras Drª Sandra Maria Warumby Zanin, Drª Josiane de Fátima Gaspari Dias, Drª Deise Prehs Montrucchio e Drª Eliane Carneiro Gomes, pela amizade e participação na minha formação desde a Graduação, vocês são grandes exemplos pra mim.

À Professora Mscª Maria Eugênia Balbi, a qual tenho profunda admiração, pelos ensinamentos desde a graduação, amizade, amparo e ajuda nas análises nutricionais.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Ciências Farmacêuticas pela incrível oportunidade de formação.

À EMBRAPA Florestas pela estrutura laboratorial, apoio e oportunidade, e ao Srº David pelos momentos de descontração e ajuda durante os trabalhos realizados.

A Capes pelo auxílio financeiro.

Aos técnicos Jair, Paulo Sergio Diniz, Maria da Graça e Mauricio, sempre dispostos a ensinar e ajudar nos experimentos.

Ao Jean Godoi, nosso querido secretário da Pós Graduação, sempre receptivo, dedicado e disposto a ajudar.

Ao Professor Drº Geraldo Picheth e ao Professor Drº Roberto Pontarolo Coordenador e Vice Coordenador da Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e incentivo.

A todos os professores que compõem o Programa de Pós Graduação e colaboraram na minha formação e crescimento científico.

Ao Departamento de química, principalmente aos laboratórios de Cristalografia e Ressonância magnética nuclear, pelo apoio nas análises.

A todos os colegas do grupo de Produtos Naturais pelas conversas, risadas e amizade.

A todos que não foram citados, mas de alguma forma participaram positivamente para a realização deste sonho.

A todos vocês sou imensamente grata.

“Se quiser ir rápido vá sozinho, se quiser ir longe vá acompanhado”.

Provérbio africano

Sonhe alto, lute, realize e sempre ultrapasse os obstáculos! O céu não é o limite!

Moura, P.F

RESUMO

Os fungos *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*, são classificados como fungos patopatogênicos sendo capazes de causar doenças severas e morte de algumas plantas como o *Pinus* sp. O *Pinus* é uma conífera que foi introduzida no Brasil, principalmente no Sul e Sudeste, como madeira de reflorestamento, na produção de madeira, celulose e seiva. Esta planta tem grande importância econômica no Brasil, movimentando milhões de dólares todos os anos. A ausência de trabalhos que estudem fungos fitopatogênicos correlacionando-os com atividades biológicas, foi um dos fatores determinantes para a realização desta pesquisa e impulsiona a continuidade da mesma. Foram determinadas as melhores condições de cultivo, visando a maior produção de massa fúngica por gravimetria para cada patógeno, sendo avaliados os parâmetros de melhor temperatura, melhor tempo de cultivo e melhor meio de cultura. Obteve-se como resultados para as melhores condições de cultivo dos fungos o meio batata dextrose, em temperaturas de 12 °C e 20 °C e um tempo de cultivo de 35 dias. Especificamente para o fungo *Diplodia pinea*, foi realizado um estudo aprofundado sendo traçado o seu perfil químico e biológico por diversas metodologias. Foram produzidos os extratos do meio de cultivo e da massa fúngica, sendo que a partir do micélio obtiveram-se os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e 50% etanol/50% água. Esses extratos foram analisados quimicamente pelas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), cromatografia em camada delgada (CCD) e testes histoquímicos. Foram realizadas as análises físico químicas de pH, umidade, cinzas, proteínas, lipídeos e fibras brutas. Realizou-se a pesquisa de quitina bem como a de exopolissacarídeos, sendo por fim realizados os testes biológicos de avaliação do potencial tóxico pelas metodologias de hemácias em suspensão, placas de ágar sangue e frente à *Artemia salina*; potencial antimicrobiano pela metodologia da concentração inibitória mínima, antioxidante pelas metodologias de redução do radical do DPPH e fosfomolibdênio e análise de compostos fenólicos pelo método de Folin Ciocalteu. Como resultados pode-se afirmar que os extratos do fungo apresentam na CLAE-UV picos característicos de substâncias químicas polares e apolares; foi constatada positividade predominante para esteroides, triterpenos e polifenóis na análise de CCD, os testes histoquímicos indicaram a possibilidade de positividade para alcaloides, polissacarídeos neutros, lignina e terpenoides. Nas análises físico químicas obteve-se os valores de pH de 6,12, teores de umidade e cinzas de 8,23% e 2,25%, respectivamente. Para proteínas, lipídeos e fibras brutas foram encontrados os valores de 13,9%, 8,9% e 27,8%, respectivamente. Para a quitina e exopolissacarídeos o fungo apresentou positividade. Nos testes biológicos os extratos hexano, clorofórmio e do meio de cultivo apresentaram toxicidade significativa, bem como atividade antioxidante para os extratos acetato de etila, etanol/água e do meio de cultivo. O potencial antimicrobiano foi considerado baixo para todas as amostras testadas. Esse perfil traçado para os patógenos e os testes aprofundados com o fungo *Diplodia pinea* são considerados um grande avanço nas pesquisas com esses microorganismos e um direcionamento importante para novos estudos científicos.

Palavras-chave: *Pinus* sp., *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Diplodia pinea*, perfil químico, análises biológicas, cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

The fungi *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* and *Diplodia pinea*, are classified as pathogenic fungi being able to cause severe diseases and death of some plants such as *Pinus* sp. *Pinus* is a conifer that was introduced in Brazil, mainly in the South and Southeast, as reforestation wood, in the production of wood, cellulose and sap. This plant has great economic importance in Brazil, moving millions of dollars every year. The absence of studies that study phytopathogenic fungi correlating them with biological activities was one of the determining factors for the accomplishment of this research and it drives the continuity of the same one. The best cultivation conditions were determined, aiming at the greatest production of fungal mass by gravimetry for each pathogen, being evaluated the parameters of better temperature, better culture time and better culture medium. The potato dextrose medium at temperatures of 12 ° C and 20 ° C and a culture time of 35 days were obtained as the best conditions for growing the fungi. Specifically for the fungus *Diplodia pinea*, an in-depth study was carried out, tracing its chemical and biological profile by several methodologies. The extracts of the culture medium and the fungal mass were produced, and extracts of hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol and 50% ethanol / 50% water were obtained from the mycelium. These extracts were chemically analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC-UV), thin layer chromatography (CCD) and histochemical tests. Physical and chemical analyzes of pH, moisture, ashes, proteins, lipids and crude fibers were carried out. Chitin as well as exopolysaccharide research were carried out. Finally, the biological tests for the evaluation of the toxic potential were carried out by the methods of suspension red cells, blood agar plates and *Artemia salina*; Antimicrobial potential by the methodology of minimum inhibitory concentration, antioxidant by the DPPH and phosphomolybdenum radical reduction methodologies and the analysis of phenolic compounds by the Folin Ciocalteu method. As a result it can be stated that the extracts of the fungus present in the HPLC-UV characteristic peaks of polar and apolar chemical substances; Predominant positivity for steroids, triterpenes and polyphenols in CCD analysis, histochemical tests indicated the possibility of positivity for alkaloids, neutral polysaccharides, lignin and terpenoids. In the chemical-physical analysis, the pH values were 6.12, moisture contents and ashes of 8.23% and 2.25%, respectively. For proteins, lipids and crude fibers were found the values of 13.9%, 8.9% and 27.8%, respectively. For chitin and exopolysaccharides the fungus presented positivity. In the biological tests extracts hexane, chloroform and culture medium showed significant toxicity as well as antioxidant activity for extracts ethyl acetate, ethanol / water and culture medium. The antimicrobial potential was considered low for all the samples tested. This profile for the pathogens and the in-depth tests with the fungus *Diplodia pinea* are considered a major advance in research with these microorganisms and an important direction for new scientific studies.

Key words: *Pinus* sp., *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea*, *Diplodia pinea*, chemical profile, biological analyzes, in vitro culture.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	ESTRUTURA MOLECULAR DA TUBOCURARINA.....	30
FIGURA 2-	ESTRUTURA MOLECULAR DA PENICILINA.....	30
FIGURA 3-	PLANTAÇÃO COMERCIAL DE <i>Pinus</i> sp.....	34
FIGURA 4-	REPRESENTAÇÃO GERAL DOS FUNGOS PLURICELULARES.....	37
FIGURA 5-	DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS POR DOMÍNIO FITOGEOGRÁFICO NO BRASIL.....	38
FIGURA 6-	ASPECTOS PATOLÓGICOS DO FUNGO <i>Armillaria</i> sp. EM <i>Pinus</i>	41
FIGURA 7-	INFECÇÃO POR <i>Botrytis cinerea</i> EM ACÍCULAS DE <i>Pinus</i>	42
FIGURA 8-	ASPECTOS PATOLÓGICOS DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	44
FIGURA 9-	FLUXOGRAMA DE TRABALHO E ANÁLISES REALIZADAS.....	49
FIGURA 10-	PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Diplodia pinea</i>	56
FIGURA 11-	CULTURA PURA DOS FUNGOS PATOGÊNICOS EM MEIO BDA.....	77
FIGURA 12-	CULTURA PURA DOS FUNGOS PATOGÊNICOS EM MEIO BD.....	77
FIGURA 13-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 12 °C - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	85
FIGURA 14-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 16 °C - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	86
FIGURA 15-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 20 °C - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	87

FIGURA 16-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 24 °C - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	88
FIGURA 17-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 28 °C - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	89
FIGURA 18-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 32 °C - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	90
FIGURA 19 -	CULTURA PURA DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i> – CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO.....	96
FIGURA 20-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICELIO CULTIVADO EM MEIO BD– 7 DIAS DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	98
FIGURA 21-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÉLIO CULTIVADO EM MEIO BD – 14 DIAS DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	99
FIGURA 22-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÉLIO CULTIVADO EM MEIO BD – 21 DIAS DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	100
FIGURA 23-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÉLIO CULTIVADO EM MEIO BD – 28 DIAS DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	101
FIGURA 24-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÉLIO CULTIVADO EM MEIO BD – 35 DIAS DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	102

FIGURA 25-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO – MICÉLIO MEIO BD DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	105
FIGURA 26-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O CONTROLE DO MEIO BD KASVI®.....	106
FIGURA 27-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO – MICÉLIO MEIO CZAPEK DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	107
FIGURA 28-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O CONTROLE DO MEIO CZAPEK.....	108
FIGURA 29-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO – MICÉLIO MEIO MALTE DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	109
FIGURA 30-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O CONTROLE DO MEIO MALTE.....	110
FIGURA 31-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA EXTRATO CLOROFÓRMIO DO MICÉLIO OBTIDO POR SOXHLET - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	112
FIGURA 32-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MICÉLIO OBTIDO POR SOXHLET - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	113
FIGURA 33-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA EXTRATO METANOL DO MICÉLIO OBTIDO POR SOXHLET MODIFICADO - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	114
FIGURA 34-	CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA EXTRATO ETANOL 50%/ÁGUA 50% DO MICÉLIO OBTIDO POR SOXHLET - FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	115
FIGURA 35-	TESTES HISTOQUÍMICOS REALIZADOS PARA O FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	117

FIGURA 36- ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO PARA ANÁLISE DE QUITINA DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	121
FIGURA 37- REDUÇÃO DO RADICAL DPPH FRENTE A EXTRATO ACETATO DE ETILA.....	130

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	ESTATÍSTICA DOS TESTES DOS MEIOS.....	79
TABELA 2-	DADOS ESTATÍSTICOS PARA A PRODUÇÃO MICELIAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.....	83
TABELA 3-	RESULTADOS DE CCD PARA A TEMPERATURA – <i>Diplodia pinea</i>	84
TABELA 4-	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	94
TABELA 5-	RESULTADOS DA CCD A PARTIR DOS EXTRATOS METANÓLICO BRUTO da MASSA FÚNGICA PARA O <i>D. pinea</i>	96
TABELA 6-	RESULTADOS DA CCD A PARTIR DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO - MICÉLIO PARA OS FUNGOS PATOGÊNICOS.....	103
TABELA 7-	CCD PARA OS CONTROLES DOS MEIOS TESTADOS.....	104
TABELA 8-	RESULTADOS DA CCD A PARTIR DOS EXTRATOS OBTIDOS POR SOXHLET PARA O FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	111
TABELA 9-	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL – <i>Diplodia pinea</i>	119
TABELA 10-	ANÁLISE ESTATÍSTICA – TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	124
TABELA 11-	ANÁLISE ESTATÍSTICA – ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	127
TABELA 12-	PARAMETROS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PARA O TESTE DE CIM.....	128
TABELA 13-	RESULTADOS OBTIDOS PARA ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> FRENTE ÀS CEPAS TESTADAS.....	129
TABELA 14-	DADOS ESTATÍSTICOS, PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH.....	132

TABELA 15- FENÓIS TOTAIS PRESENTES EM DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	133
TABELA 16- ANÁLISE DO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	134

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-	ESCALA TAXONÔMICA DO <i>Pinus</i> sp.....	34
QUADRO 2-	COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	52
QUADRO 3-	CINÉTICA DE TEMPERATURA PARA OS FUNGOS TESTADOS.....	54
QUADRO 4-	FASE MÓVEL E REVELADORES UTILIZADOS NA CCD.....	58
QUADRO 5-	MÉTODO POR GRADIENTE EMPREGADO NAS ANÁLISES	60
QUADRO 6-	REAGENTES E CONSTITUINTES QUÍMICOS UTILIZADOS NOS TESTES HISTOQUÍMICOS.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-	TESTE DOS MEIOS PARA OS FUNGOS PATOGENICOS	79
GRÁFICO 2-	CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA DE <i>Armillaria</i> sp.....	81
GRÁFICO 3-	CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA DE <i>Botrytis cinerea</i>	81
GRÁFICO 4-	CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA DE <i>Diplodia pinea</i>	82
GRÁFICO 5-	CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE <i>Armillaria</i> sp.....	92
GRÁFICO 6-	CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE <i>Botrytis cinerea</i>	92
GRÁFICO 7-	CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE <i>Diplodia pinea</i>	93
GRÁFICO 8-	RESULTADOS GRÁFICOS OBTIDOS NO TESTE DE EXOPOLISSACARÍDEOS – MEIO NÃO CONCENTRADO EM mg PARA O FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	122
GRÁFICO 9-	RESULTADOS GRÁFICOS OBTIDOS NO TESTE DE EXOPOLISSACARÍDEOS – MEIO CONCENTRADO EM mg PARA O FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	122
GRÁFICO 10-	ATIVIDADE HEMOLÍTICA NOS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	126
GRÁFICO 11-	REDUÇÃO DO RADICAL DPPH EM FUNÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO.....	131
GRÁFICO 12-	REDUÇÃO DO RADICAL DPPH EM FUNÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA.....	131
GRÁFICO 13-	REDUÇÃO DO RADICAL DPPH EM FUNÇÃO DO EXTRATO ETANOL/ÁGUA DA MASSA FÚNGICA.....	132
GRÁFICO 14-	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>D. pinea</i> PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO.....	134

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A2 -	Isolado utilizado de <i>Armillaria sp.</i>
Abs -	Absorbância
<i>A. limonea</i> -	<i>Armillaria limonea</i>
<i>A. mellea</i> -	<i>Armillaria mellea</i>
ANOVA -	Análise de variância
<i>A. novazelandiae</i> -	<i>Armillaria novazelandiae</i>
<i>A. procera</i> -	<i>Armillaria procera</i>
<i>A. puiggarii</i> -	<i>Armillaria puiggarii</i>
ATCC -	American type culture collection
Atm -	Atmosférica
BD -	Batata dextrose
BDA -	Batata dextrose ágar
BBC -	British Broadcasting Corporation
<i>B. cinérea</i> -	<i>Botrytis cinerea</i>
BOD -	Estufa incubadora microbiológica Incubadora
CCD -	Cromatografia em Camada Delgada
C - H	Ligação simples carbono hidrogênio
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
C = O -	Ligação dupla carbono oxigênio
CL50 -	Concentração letal 50%
CLAE-	Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
CuSO ₄ -	Sulfato de cobre
DMT -	N,N-dimetitriptamina
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DP -	Desvio Padrão
<i>D. pinea</i> -	<i>Diplodia pinea</i>
DPPH -	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
EAC.ET -	Extrato acetato de etila
EAG.g ⁻¹	Equivalente de ácido gálico
ECLO -	Extrato clorofórmio
EET50%/H2O50% -	Extrato etanol e água

EET/H ₂ O -	Extrato etanol e água
EHEX -	Extrato hexano
EMEOH -	Extrato metanol
EMEIO -	Extrato do meio de cultura
EP -	Exopolissacarídeos
F -	Fator de conversão
IC de 95% -	Intervalo de confiança
K ₂ SO ₄ -	Sulfato de potássio
M -	Molaridade
MDF -	Medium Density Fiberboard
MHB -	Caldo Mueller-Hinton
N -	Normalidade
NaOH -	Hidróxido de sódio
Na ² CO ³ -	Carbonato de cálcio
N – H -	Ligação simples nitrogênio hidrogênio
P -	Peso
Pa -	Peso da amostra
PBS -	Tampão fosfato salino
pH -	Potencial hidrogênico
Ps -	Peso do cadinho mais amostra após a dessecação
<i>P. taeda</i> -	<i>Pinus taeda</i>
Pu -	Peso da amostra mais cadinho antes da dessecação
RL	Radicais livres
Rpm -	Rotação por minuto
RPMI -	Roswell Park Memorial Institute
SJO -	São José do Ouro
TTC -	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UC -	Umidade e cinzas
UFC/mL	Unidade formadoras de colônia por mililitos
UV -	Ultravioleta
V -	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior que
<	Menor que
+	Positivo ou mais
-	Negativo ou menos
°C	Grau celsius
%	Porcento
•	Radical
±	Mais ou menos
cm	Centímetro
g	Grama
g/L ⁻¹	Grama por litro
mg	Miligrama
mg.mL ⁻¹	Miligrama por mililitro
mL ⁻¹	Mililitro
mm	Milímetros
nm	Nanômetro
m/V	Massa/volume
q.s.p	Quantidade suficiente para
µL	Microlitro
µg	Micrograma
µg.mL ⁻¹	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	OBJETIVO GERAL.....	27
1.1.1	Objetivos específicos.....	27
A.	Para os fungos <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	27
B.	Para o fungo <i>Diplodia pinea</i>	27
2.	REVISÃO.....	29
2.1	PRODUTOS NATURAIS.....	29
2.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	30
2.2.1	ESTERÓIDES E TRITERPENOS.....	31
2.2.2	FLAVONÓIDES.....	32
2.2.3	POLIFENÓIS.....	32
2.2.4	ALCALÓIDES.....	33
2.3	<i>Pinus</i>	33
2.3.1	O <i>Pinus</i> no Brasil.....	35
2.4	FUNGOS.....	36
2.4.1	Fungos Fitopatogênicos.....	38
2.5	<i>Armillaria</i> sp.....	40
2.6	<i>Botrytis cinerea</i>	42
2.7	<i>Diplodia pinea</i>	43
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1	MATERIAIS UTILIZADOS.....	46
3.2	METODOLOGIAS.....	48
3.2.1	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	50
3.2.2	CULTIVO E SELEÇÃO DO MEIO LÍQUIDO PARA OS FUNGOS <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	50
3.2.3	CURVA DE TEMPERATURA DE <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	53

3.2.4	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA AO LONGO DO TEMPO DE <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	54
3.2.5	PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA DE <i>Diplodia pinea</i>	55
3.2.6	PRODUÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE <i>Diplodia pinea</i>	56
3.2.7	PRODUÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA BRUTO DO CALDO DE CULTIVO DE <i>Diplodia pinea</i>	56
3.2.8	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> POR SOXHLET.....	57
3.2.9	ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	57
3.2.10	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV).....	58
3.2.11	TESTES HISTOQUÍMICOS PARA O FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	60
3.2.12	AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA DE <i>Diplodia pinea</i>	61
3.2.12.1	Determinação do teor de umidade.....	61
3.2.12.2	Determinação do teor de cinzas	62
3.2.12.3	Determinação do potencial hidrogeniônico.....	62
3.2.12.4	Determinação de proteínas totais.....	63
3.2.12.5	Determinação de fibras brutas.....	63
3.2.12.6	Determinação do teor de lipídeos.....	64
3.2.13	DETERMINAÇÃO DE QUITINA EM <i>Diplodia pinea</i>	65
3.2.14	PESQUISA DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM <i>Diplodia pinea</i>	65
3.2.15	TESTES BIOLÓGICOS.....	66
3.2.15.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE <i>Diplodia pinea</i>	67
3.2.15.1.1	Frente à <i>Artemia salina</i>	67
3.2.15.1.2	Teste da atividade hemolítica.....	68
3.2.15.1.2.1	Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão...	68
3.2.15.1.2.2	Teste de atividade hemolítica em placas de ágar sangue.....	69
3.2.15.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Diplodia pinea</i>	69

3.2.15.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	71
3.2.15.3.1	Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH.....	72
3.2.15.3.2	Avaliação de Polifenóis Totais pelo método de Folin Ciocalteau.....	73
3.2.15.3.3	Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Fosfomolibdênio.....	74
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.1	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	76
4.2	CULTIVO E SELEÇÃO DO MEIO LÍQUIDO PARA OS FUNGOS <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	78
4.3	CURVA DE TEMPERATURA DE <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	80
4.4	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA AO LONGO DO TEMPO DE <i>Armillaria</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Diplodia pinea</i>	91
4.5	PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA DE <i>Diplodia pinea</i>	94
4.6	PRODUÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE <i>Diplodia pinea</i>	95
4.7	PRODUÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA BRUTO DO CALDO DE CULTIVO DE <i>Diplodia pinea</i>	102
4.8	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> POR SOXHLET.....	111
4.9	ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	116
4.10	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV).....	116
4.11	TESTES HISTOQUÍMICOS PARA O FUNGO <i>Diplodia pinea</i> ..	116
4.12	AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE <i>Diplodia pinea</i>	117
4.12.1	Determinação do teor de umidade.....	117

4.12.2	Determinação do teor de cinzas.....	117
4.12.3	Determinação do potencial hidrogeniônico.....	118
4.12.4	Determinação de proteínas totais.....	118
4.12.5	Determinação de fibras brutas.....	118
4.12.6	Determinação do teor de lipídeos.....	119
4.13	DETERMINAÇÃO DE QUITINA EM <i>Diplodia pinea</i>	119
4.14	PESQUISA DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM <i>Diplodia pinea</i>	121
4.15	TESTES BIOLÓGICOS.....	123
4.15.1	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE <i>Diplodia pinea</i>	123
4.15.1.1	Frente à <i>Artemia salina</i>	123
4.15.1.2	Teste da atividade hemolítica.....	125
4.15.1.2.1	Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão.....	125
4.15.1.2.2	Teste de atividade hemolítica em placas de ágar sangue.....	127
4.15.2	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Diplodia pinea</i>	128
4.15.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	130
4.15.3.1	Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH.....	130
4.15.3.2	Avaliação de Polifenóis Totais pelo método de Folin Ciocalteu.....	132
4.15.3.3	Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Fosfomolibdênio.....	133
5.	CONCLUSÃO.....	136
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	138
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
8.	ANEXO.....	149

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios das civilizações são descritos o uso de produtos naturais, seja por seu potencial farmacológico ou tóxico (ARGENTA et al., 2011). Achados arqueológicos comprovam o amplo uso de drogas em povos como egípcios, gregos e árabes, bem como em outras civilizações. No Brasil os médicos vindos de Portugal passaram a reconhecer a importância dos remédios indígenas, sendo a química em produtos naturais a mais antiga dentre as químicas estudadas em nosso país (PINTO et al., 2002).

Compreendem os estudos em produtos naturais as pesquisas realizadas com plantas medicinais, micromoléculas de plantas, produtos naturais de organismos marinhos e produtos naturais de microrganismos. A biodiversidade brasileira representa um grande reservatório para a descoberta de novas moléculas como alcaloides, flavonoides e cumarinas (BERDY, 2005). Muitas substâncias de interesse farmacológico já foram identificadas e os estudos voltam-se para um avanço tecnológico e emprego de novas metodologias de identificação de metabólitos com grande aplicabilidade em diversas áreas (PINTO et al., 2002).

Produtos farmacêuticos e agroquímicos são fundamentais para nossa população, tendo em vista a qualidade de vida. Com base nisso pode-se afirmar que as pesquisas realizadas com produtos naturais têm sumária importância. Inúmeros medicamentos sintetizados foram isolados primordialmente de fontes naturais como o alcalóide morfina e o terpeno antimalárico ácido artemisínico. Os isolados de microrganismos têm importância incontestável na descoberta de medicamentos de grande impacto como antibióticos (penicilina, cefalosporinas), produtos menos prejudiciais à saúde, como novos herbicidas ou fármacos com menores efeitos colaterais (PINTO et al., 2002).

Dentre os microrganismos passíveis de pesquisas de substâncias de interesse podemos citar os fungos que podem ser descritos como organismos eucariontes, aclorofilados, uni ou pluricelulares, que são filamentosos em pelo menos um estágio de vida e podem ser saprófitas, parasitas ou simbiontes. Apresentam parede celular composta de quitina e

são encontrados em diversos sistemas como vegetais, animais, outros fungos, solo, água e ar, tendo importância na ciclagem de compostos orgânicos e inorgânicos na natureza (LOBATO, VARGAS e SILVEIRA, 2009). No Brasil foi documentado um total de 3608 espécies de fungos sendo 523 endêmicos (FORZZA et al., 2010).

Os fungos são capazes de realizar associações com diferentes espécies vegetais sendo denominados micorrízicos ou fitopatogênicos. Fungos micorrízicos formam micorrizas que são associações entre o fungo no solo e a raiz do vegetal (SOUZA et al., 2006). Fungos fitopatogênicos, atacam as plantas causando lesões em órgãos de reserva, no caule, raízes, no xilema e folhas, levando a morte da planta dependendo da severidade da doença (BUENO; FISCHER, 2006).

O *Pinus* é um gênero de planta que atualmente apresenta grande importância econômica, devido à produção de celulose, papel, placa de fibra de média densidade (Medium Density Fiberboard - MDF) e resina sendo importante para diversas atividades industriais. A região Sul do Brasil é o maior produtor de *Pinus* que pode ser infectado por fungos fitopatogênicos (SILVA, 2014) que tornam-se fontes, muitas vezes inexplorada, de substâncias oriundas do seu metabolismo.

Nas áreas da saúde, buscam-se constantemente fontes potenciais de substâncias ativas, com qualidade e segurança, de uso em concentração conhecida e que não acarretem danos ao paciente. Pode-se afirmar que a contínua necessidade de disponibilização de novos produtos farmacêuticos requer a pesquisa e desenvolvimento de produtos que possam contribuir com a saúde humana e animal. Existem relatos na literatura evidenciando que as substâncias de origem natural extraídas de plantas ou microrganismos, como os fungos, podem constituir um grupo de compostos com grande interesse farmacológico apresentando potencial utilização nas áreas humana, como na indústria farmacêutica (antitumorais, antioxidantes, antimicrobianos), veterinária e agrícola. Como exemplo, pode-se citar os alcaloides, grupo químico com reconhecida atividade colinérgica, anticolinérgica, antimalárica e antineoplásica, que estão presentes em plantas e em alguns fungos (PIRES, 2010).

1.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os aspectos de cultivo dos fungos *Armillaria sp.*, *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*, e a abordagem química e biológica do fungo *Diplodia pinea*.

1.1.1 Objetivos específicos

A - Para os fungos *Armillaria sp.*, *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*:

- Avaliar a morfologia dos cultivos em meio sólido e líquido;
- Caracterizar o melhor meio, temperatura e tempo de cultivo, para a produção de biomassa fúngica.

B - Para o fungo *Diplodia pinea*:

- Obter o extrato metanólico bruto da massa fúngica;
- Obter o extrato acetato de etila bruto para os meios de cultivo (controle e residual);
- Obter os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, etanol e água por Soxhlet para a massa fúngica;
- Analisar por Cromatografia em Camada Delgada os extratos do micélio e meio de cultivo;
- Analisar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência os extratos do micélio e meio de cultivo;
- Realizar a partir do micélio, testes histoquímicos;
- Realizar a partir do fungo liofilizado os testes físico-químicos;
- Analisar a partir do fungo liofilizado a quantidade de quitina;
- Analisar a partir do meio de cultivo o teor de exopolissacarídeos;
- Avaliar a toxicidade dos extratos da massa fúngica e do meio de cultivo;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos da massa fúngica e do meio de cultivo;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos da massa fúngica e do meio de cultivo, pelos métodos do radical DPPH e fosfomolibdênio;
- Pesquisar o teor de fenólicos totais dos extratos da massa fúngica e do meio

de cultivo, pelo método de Folin Ciocalteau.

2. REVISÃO

2.1 PRODUTOS NATURAIS

O uso de produtos naturais pelo ser humano data desde os primórdios das primeiras civilizações. A busca pela cura das doenças sempre foi um desafio para o homem que buscava uma maneira de aliviar as patologias que os acometia. Civilizações antigas documentavam o uso principalmente de plantas medicinais e suas aplicações. Egito, Grécia e China foram civilizações que tiveram grande destaque no emprego desses produtos. Além do uso de compostos com atividade farmacológica, na cura de doenças, descobriram-se diversos compostos tóxicos ao homem como os venenos (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

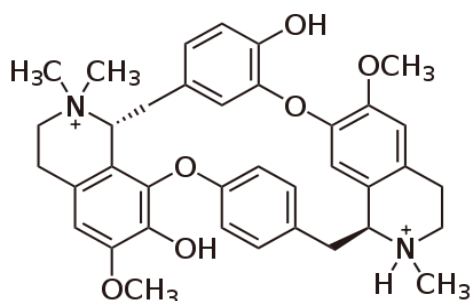
No Brasil os índios sempre utilizaram os recursos disponíveis na natureza para sobreviver, utilizando plantas para cura de doenças em diversas formas como chás, infusões, cataplasmas, entre outros, corantes e até alimentos. Após o descobrimento do Brasil muitos produtos foram comercializados como especiarias, devido ao amplo bioma que até hoje possuímos (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

O conhecimento passado pelos povos através do tempo é de grande importância seja na descoberta de medicamentos, plantas tóxicas e atividades biológicas. Conhecimento esse adquirido pela observação dessas civilizações. Devido à complexidade estrutural de algumas moléculas, somente após anos da sua descoberta e isolamento estas foram elucidadas, um exemplo disso é a tubocurarina (Figura 1), um bloqueador neuroganglionar, amplamente utilizado pelos índios e que teve sua caracterização somente doze anos após seu descobrimento (VIEGAS, BOLZANI e BARREIRO, 2006).

Outro exemplo muito importante foi à descoberta da penicilina (Figura 2) em 1928 por Alexander Fleming, isolada em 1938 do fungo *Penicillium chrysogenum* por Ernst B. Chain e Howard W. Florey na Inglaterra. Um antibiótico de amplo espectro com atividade sobre inúmeras bactérias como o *Staphylococcus aureus*, a penicilina é utilizada até hoje para patologias como meningite, sífilis, pneumonia, entre outras (NOSSA

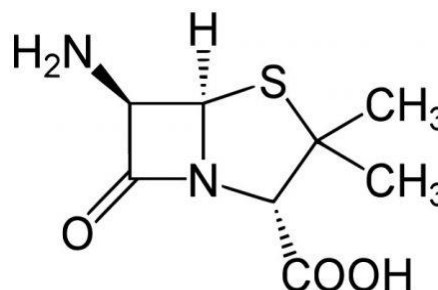
CAPA, 2009).

FIGURA 1- ESTRUTURA MOLECULAR DA TUBOCURARINA



FONTE: MUNIZ, 2004. ADAPTADO.

FIGURA 2 – ESTRUTURA MOLECULAR DA PENICILINA



FONTE: HERNÁNDEZ, 2013. ADAPTADO.

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os compostos derivados de plantas que possuem a atividade medicinal ou tóxica são os metabólitos ou compostos secundários. Sabe-se atualmente que fungos que parasitam plantas ou realizam associações benéficas com a mesma, podem sintetizar compostos secundários como uma planta, tornando-os uma fonte alternativa de obtenção destes compostos. Inúmeros microorganismos já foram relatados na literatura como produtores de metabólitos com atividade medicinal promissora como os antineoplásicos, antiinflamatórios, antioxidantes, entre outros. Isso os torna de vital importância na pesquisa, dado o seu potencial tecnológico para a área de saúde (SILVA, 2014).

Relatos na literatura, como o de Silva (2014), mostram que os fungos sintetizam um número significativo de compostos secundários inéditos e com diversas atividades biológicas. Segundo Schultz et al. (2002) e Yang et al. (2012), 80% dos compostos secundários produzidos por fungos que parasitam ou realizam simbiose com plantas possuem alguma atividade biológica. Esses metabólitos podem ser idênticos ou semelhantes aos sintetizados pelas plantas hospedeiras. Um exemplo é o caso do anticancerígeno paclitaxel também conhecido como taxol, que inicialmente foi extraído da planta *Taxus brevifolia*, sendo posteriormente isolado do fungo *Taxomyces andreanae*. Outros exemplos de substâncias são a

Vincristina sintetizada pela planta *Catharanthus roseus* e pelo fungo hospedeiro *Fusarium oxysporum* e a Huperzina A sintetizada pela planta *Huperzia serrata* e pelo fungo hospedeiro *Acremonium* sp. (SILVA, 2014).

A biossíntese dos metabólitos secundários se origina de produtos intermediários ou monoméricos do metabolismo primário. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo especializado, sendo estes divididos em diferentes grupos dependendo de sua estrutura química e principal ação. Dentre os principais grupos podem-se citar os esteroides e triterpenos, flavonoides, polifenóis e os alcaloides (SILVA, 2014).

2.2.1 ESTEROIDES E TRITERPENOS

Os esteroides correspondem a uma grande classe de compostos encontrados vastamente no reino vegetal e que podem ser sintetizados por microorganismos. Muitos esteroides possuem ação terapêutica sendo eficientes contra doenças cardiovasculares, por serem capazes de reduzir os níveis de colesterol. Os esteroides são encontrados nas frações menos polares dos extratos e são triterpenóides modificados contendo o sistema tetracíclico do ciclopentanoperidrofenantreno (QUEIROZ, 2009). As unidades isoprênicas bioquimicamente ativas são dois ésteres difosfato, o difosfato de dimetilalila e o difosfato de isopentenila. Estas unidades são derivadas do metabolismo do acetato advindos da rota do ácido mevalônico, que é formado por três moléculas de acetil-coenzima A (DEWICK, 2002).

Os terpenóides formam uma grande e estruturalmente diversa família de produtos naturais, derivada de unidades isoprênicas. De acordo com a quantidade de unidades isoprênicas, os compostos terpênicos são classificados como monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (QUEIROZ, 2009). Podem ser em sua maioria, classificados como hidrocarbonetos, compostos apenas por carbono e hidrogênio. São acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos e pentacíclicos e aromáticos (DEWICK, 2002).

Derivados do isopreno seu precursor é o mevalonato. Porém em

alguns organismos, alguns terpenos são provenientes do metileritritol fosfato. Por serem precursores de outras classes de metabolitos, apresentam diversas ações terapêuticas como antitumoral, antiinflamatória, ação sobre o musculo cardíaco e na síntese de vitaminas (DEWIK, 2002).

2.2.2 FLAVONOIDES

Os flavonoides são metabólitos secundários da classe dos polifenóis, apresentam em geral baixo peso molecular, e são encontrados amplamente no reino vegetal, podendo ser sintetizados por fungos. Estes compostos tem origem de biossíntese mista, são sintetizados a partir da rota do ácido chiquímico e da acetil coenzima A (DEWIK, 2002).

A via do ácido chiquímico origina o ácido cinâmico e seus derivados como os ácidos cafeico e ferúlico, por exemplo, com nove átomos de carbono na forma de coenzima A (DEWIK, 2002).

A via do acetato origina um tricetídeo de seis átomos de carbono, a condensação de um destes derivados de ácido cinâmico com o tricetídeo gera uma chalcona com 15 átomos de carbono, que é o precursor inicial de toda a classe dos flavonóides. A partir da chalcona os demais derivados flavonoídicos são formados (DEWIK, 2002).

Podem ser subdivididos em chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, diidroflavonóis, isoflavonas, antocianinas e auronas. Inúmeras ações terapêuticas já relatadas como anti-inflamatória, antialérgica e antitumoral (DEWIK, 2002).

2.2.3 POLIFENOIS

Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, são subdivididos em classes de acordo com a estrutura química de cada substância, são obtidos por duas vias primárias a via do acetato e do chiquimato. Os principais grupos de polifenóis são os ácidos fenólicos como, por exemplo, o ácido clorogênico e o resveratrol (EFRAIM, ALVES e JARDIM, 2011).

Apresentam uma estrutura química comum, derivada do benzeno, ligada a um grupo hidrofílico, são classificados em quatro grupos, os flavonoides (flavonas, flavanonas, catequinas e antocianinas), ácidos fenólicos, lignanas e etilbenos (reveratrol) (EFRAIM, ALVES e JARDIM, 2011).

Os compostos fenólicos têm sido amplamente estudados devido as suas propriedades farmacológicas como uma potente atividade antioxidante na prevenção de reações oxidativas e de formação de radicais livres, na proteção contra danos ao DNA das células, seu potencial antialérgico e anti-inflamatório (EFRAIM, ALVES e JARDIM, 2011).

2.2.4 ALCALOIDES

Os alcaloides são substâncias de caráter básico, sintetizados por plantas, fungos e animais. Possuem em estrutura química básica átomos de nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono. Como exemplos pode-se citar a cafeína, cocaína, codeína, entre outros (SIMÕES et al., 1999).

Possuem promissora ação terapêutica como anestésico, analgésico, psicostimulante e neurodepressor. São classificados quanto à sua atividade biológica, quanto à sua estrutura química e quanto à sua origem biossintética. Podem ser divididos em três grupos: alcaloides verdadeiros, que possuem anel heterocíclico com um átomo de nitrogênio e sua biossíntese se dá através de um aminoácido; protoalcaloides, o átomo de nitrogênio não pertence ao anel heterocíclico e se originam de um aminoácido e pseudoalcaloides, são derivados de terpenos ou esteroides e não de aminoácidos (SIMÕES et al., 1999).

2.3 *Pinus*

O gênero *Pinus* (figura 3) engloba o grupo das plantas lenhosas, é geralmente arborescente e faz parte do reino vegetal. É uma espécie exótica no Brasil, sua classificação taxonômica segundo Schultz (1968) é apresentada no quadro 1.

QUADRO 1 - ESCALA TAXONÔMICA DO *Pinus sp.*

Reino	Vegetal
Divisão	Embryophytae siphonogamae
Subdivisão	Gymnospermae
Classe	Coniferopsida
Ordem	Coniferae
Família	Pinaceae
Subfamília	Pinoideae
Gênero	Pinus

FONTE: Schultz (1968)

FIGURA 3 – PLANTAÇÃO COMERCIAL DE *Pinus sp.*

FONTE: RETIRADO DE
http://ambientes.ambientebrasil.com.br/florestal/artigos/pinus_na_silvicultura_brasileira.html. ADAPTADO.

Este gênero apresenta como características anatômicas raios visíveis sob lente no topo da planta, camadas de crescimento distinta, ou seja, transição brusca entre o lenho inicial e o tardio, canais de resina visíveis sob lente em disposição axial e radial. O lenho juvenil é menos resistente, porém mais flexível do que o lenho adulto, devido a menor massa específica, traqueoides mais curtos, maiores ângulos fibrilares, paredes celulares mais finas, maiores diâmetros de lumens, menor percentagem de lenho tardio, mais lenho de compressão e alta contração longitudinal. Devido a isso, geralmente a madeira de árvores mais jovens, maior porcentagem de lenho juvenil na seção do tronco, possui propriedades mecânicas mais baixas que árvores com lenho adulto (SANTINI, HASELEIN e GATTO, 2000).

O *Pinus* é uma conífera suscetível ao ataque de fungos micorrízicos e patogênicos também chamados emboloradores, manchadores e apodrecedores. Apresenta facilidade para secagem da madeira, sendo uma planta importante economicamente devido a sua extensa aplicabilidade (IPT, 1989).

Como usos pode-se citar o uso da madeira na construção civil, uso na fabricação de móveis, uso como madeira de reflorestamento, produção de resina, celulose, entre outros (IPT, 1989).

2.3.1 O *Pinus* no Brasil

O *Pinus* está presente no Brasil há mais de um século. Foi introduzido principalmente pelos imigrantes europeus, inicialmente como planta ornamental e produção de madeira. Os primeiros registros datam de 1880 nas Ilhas Canárias no Rio Grande do Sul. Em 1936 ocorreram os primeiros ensaios com espécies europeias que não se adaptaram bem ao clima. Em 1948 espécies americanas foram introduzidas destacando-se o *Pinus elliottii* e o *Pinus taeda* por sua facilidade de cultivo (SHIMIZU, 2008).

A partir daí as plantações começaram a proliferar rapidamente, principalmente nos anos 70, em ambientes abertos, de alta insolação, adaptando-se a solos de baixa fertilidade (BURGUEÑO et al., 2013).

O *P. taeda* é uma espécie com ampla distribuição no Leste e Sudeste dos Estados Unidos. Apresenta um crescimento rápido, porém as tortuosidades, bifurcações e ramos grosseiros diminuem a qualidade dessa planta. É uma espécie que resiste a geadas apresentando maior produtividade e qualidade no Sul e Sudeste do Brasil. A madeira de *P. taeda* é utilizada na produção de peças serradas para estruturas, confecção de móveis, embalagens, molduras e chapas de diversos tipos (SHIMIZU, 2008).

O *Pinus elliottii* se destaca para produção de madeira e resina sendo menos resistente a geadas que o *P. taeda*. Sua produtividade é ampliada quando o plantio se dá na região de cerrado das regiões Sul e Sudeste do Brasil. A extração de resina possibilitou sua ampla exportação, o que em 2002 já representava uma movimentação financeira de US\$ 25 milhões

(SHIMIZU, 2008).

O *Pinus oocarpa* é uma espécie de *Pinus* tropical originária do México e América Central. Tem produtividade em clima temperado-seco até o clima subtropical úmido, sendo que o melhor desempenho desta espécie no Brasil se concentra no planalto, especialmente no Cerrado, devido a sua tolerância à seca. A sua madeira é moderadamente dura, resistente e de alta qualidade, essa espécie também produz resina em quantidade viável para extração e comercialização (SHIMIZU, 2008).

As exportações brasileiras de plantas do gênero *Pinus* alcançaram US \$ 5,5 bilhões em 2013, aumentando a participação no superávit da balança comercial nacional de 19,1% para 28,1%, sendo que esse montante é de 23,4% produzido com as matérias-primas fornecidas por plantações comerciais (ABRAF, 2013).

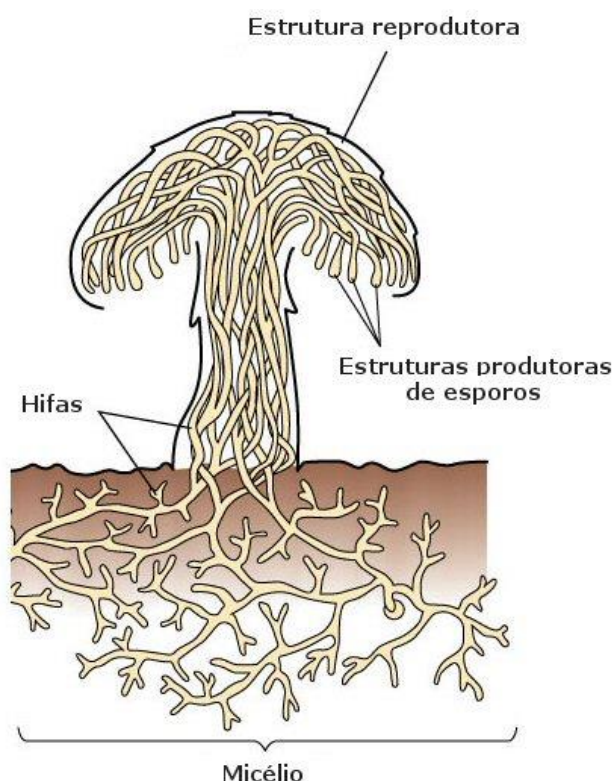
O gênero *Pinus* engloba mais de 100 espécies e tem um grande potencial a ser explorado.

2.4 FUNGOS

Os fungos são amplamente difundidos e estão presentes em basicamente todo o mundo. Estes apresentam características peculiares que os diferem e os classificam no Domínio Eukarya, Reino Fungi tendo aplicabilidade positiva e negativa em nosso dia a dia (SILVA e COELHO, 2006). Como características gerais pode-se citar que os fungos são eucariotos, uni ou pluricelulares, sendo que os últimos possuem células que se agrupam em filamentos denominados hifas. O conjunto de hifas forma por fim o que denominamos de micélio, conforme representado no esquema da figura 4 (MAIA e CARVALHO, 2010). As células fúngicas não possuem plastídios e nem centríolo. Apresentam a estrutura de Golgi e peroxissomos, tem parede celular constituída de quitina e β -glucana, sendo sua membrana celular composta de ergosterol. São heterotróficos obtendo seus nutrientes por absorção pela membrana celular a partir da degradação de material orgânico colonizado por eles (SILVA e COELHO, 2006). A partir os fungos conseguem nutrientes para o seu crescimento, participando nos ciclos de

carbono, nitrogênio e fósforo sendo estes microorganismos de grande importância ambiental. Podem ter reprodução sexuada ou assexuada que originam os esporos (propagadores da espécie) (MAIA e CARVALHO, 2010).

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO GERAL DOS FUNGOS PLURICELULARES



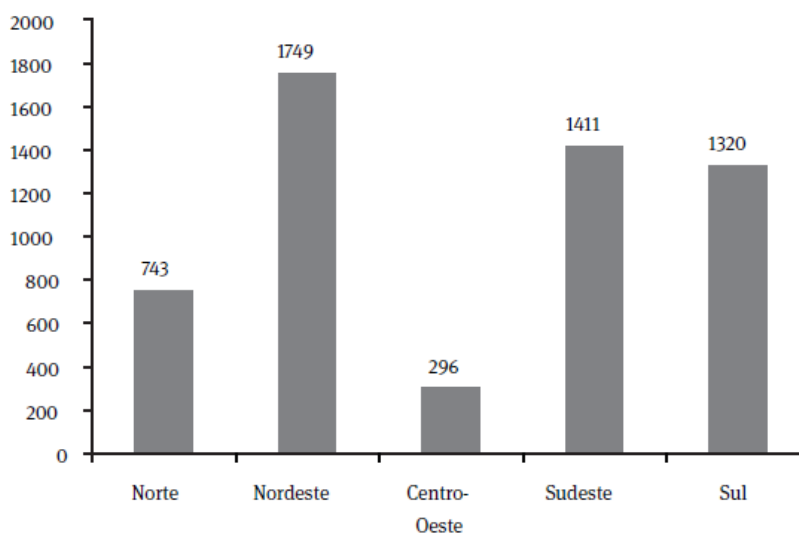
FONTE: RETIRADO DE <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/biofungos2.php>
ADAPTADO.

A classificação mais recente dos fungos considera os filos Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota, sendo considerados sete filos, 10 subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens (HIBBETT et al., 2007).

Quando parasitas, os fungos podem causar doenças como micoses, alergias, patologias em vegetais e deterioração de diversos materiais. Apresentam características que podem ser utilizadas positivamente como sua ação fermentativa na síntese de álcool etílico e dióxido de carbono, sua aplicação terapêutica por meio de antibióticos e sua aplicação na área de alimentos por conterem enzimas que atuam em processo biotecnológicos (SILVA e COELHO, 2006).

Estima-se que existam por volta de 99.000 espécies de fungos catalogadas no mundo. No Brasil 3,7% do valor mundial encontra-se catalogado, porém há ainda divergência desse percentual entre os autores. Estudos revelam que o maior percentual de fungos por domínio fitogeográfico encontra-se no Nordeste seguido do Sudeste (figura 5) (MAIA e CARVALHO, 2010).

FIGURA 5 – DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS POR DOMÍNIO FITOGEOGRÁFICO NO BRASIL



FONTE: MAIA e CARVALHO, 2010. ADAPTADO.

2.4.1 Fungos Fitopatogênicos

Patógeno por definição é um organismo capaz de causar patologia nas plantas por interferir no seu metabolismo celular devido à liberação de enzimas, toxinas, fitoreguladores ou outra substância lesiva à planta. Estes microorganismos também podem parasitar a planta absorvendo os nutrientes da célula vegetal para sua utilização (AGRIOS, 1997). Eles causam graves doenças que dependendo do patógeno e intensidade ocasionam lesões nos órgãos de reserva, caule, raízes, sistema vascular, podendo levar ao tombamento de plântulas ou plantas bem desenvolvidas. Em casos mais críticos pode culminar na morte da planta (BUENO e FISHER, 2006).

A maior parte dos fungos patogênicos passa parte do seu ciclo de vida no solo e parte na planta. Outros parasitam o hospedeiro e somente

seus esporos habitam o solo até encontrarem outro hospedeiro para iniciarem a sua reprodução. Há os que vivem parte do seu ciclo de vida no hospedeiro e parte do ciclo como saprófitas parasitando tecidos mortos depositados no solo. Por fim há os que parasitam a planta podendo migrar para tecidos mortos de outras plantas no solo (MICHEREFF, 2013).

A sobrevivência destes fungos depende principalmente de condições de temperatura e umidade do ambiente. A maioria dos micélios sobrevive entre -5 °C a 45 °C, os esporos também resistem a uma ampla faixa de temperatura, dependendo, porém de condições específicas para a sua germinação. Eles podem penetrar no hospedeiro diretamente a nível subcuticular, nível celular intra ou intercelular, por aberturas naturais (estômatos, por exemplo) ou por lesões na planta como rachaduras nas raízes (MICHEREFF, 2013).

Os fungos que parasitam o solo podem sobreviver por um longo período devido às estruturas de resistência que possuem, levando a perda de culturas e inviabilizando o solo (AMBRÓSIO et al., 2009).

Como sintomas observados na planta podem-se citar, levando em consideração o fitopatógeno, a podridão, tombamento, lesões escuras ou avermelhadas, cancos, seca de ponteiros, folhas murchas e amareladas (BUENO e FISHER, 2006).

Para o tratamento das plantas, autores como Bueno e Fisher, citam princípios biológicos como a exclusão que atua na prevenção da entrada de um patógeno em uma área da planta, a erradicação que seria a eliminação do patógeno na sua área de ocorrência, a proteção que constitui na formação de uma barreira protetora entre as partes suscetíveis da planta e o patógeno, a imunização por meio do desenvolvimento de plantas mais resistentes, a terapia com o intuito do restabelecimento da saúde da planta doente, a regulação por modificações ambientais e a evasão que consiste na retirada do patógeno do ambiente em que a planta se encontra (BUENO e FISHER, 2006).

Como aspectos maléficos destes fungos, além da sua patogenia podem-se citar a liberação de substâncias alucinógenas, cancerígenas e a agressão a animais e humanos. Como aspectos benéficos citam-se o

controle biológico e decomposição de matéria orgânica que estes são capazes de realizar, o emprego de enzimas e polissacarídeos em indústrias alimentícia e farmacêutica, além de isolamento de metabólitos de interesse com atividades biológicas como a atividade antioxidante.

As principais patologias que atacam os plantios de *Pinus* são a armilariose provocada pelo fungo *Armillaria* sp., a necrose e queima de ponteiros causada pelo *Botrytis cinerea* e a seca de ponteiros ocasionada pelo patógeno *Diplodia pinea* (FERREIRA, 1989).

2.5 *Armillaria* sp.

O gênero *Armillaria*, pertence à ordem Agaricales, classe Basidiomycetes, a família Tricholomataceae e conta atualmente com mais de 50 espécies identificadas. As espécies de *Armillaria* são primeiramente identificadas pela morfologia dos basidiomas, sendo algumas características notáveis do basidioma o píleo carnoso, estipe carnoso, anel presente, persistente, membranoso ou subaracnóide, volva ausente, lamelas adnexas, adnatas ou decurrentes; basidiósporos lisos, hialinos, brancos em massa (SILVA, 2014).

O fungo *Armillaria* é classificado como patogênico parasita facultativo, saprófita obrigatório ou simbionte e necessita de um grande uso energético para crescer e causar infecções. Causa uma patologia conhecida como armilariose, onde ocorre a podridão de raízes causada pelo fungo, sendo esta doença considerada economicamente importante em espécies de *Pinus* e *Eucalyptus*. Os sintomas da infecção incluem grande exsudação de resina ao redor das raízes ou do tronco que forma um acúmulo no solo de resina solidificada, presença de placas miceliais de cor esbranquiçada que são formadas na região da entrecasca, sendo este crescimento micelial a característica mais importante para o diagnóstico da doença. A Figura 6 ilustra a infecção causada por este parasita (AUER, GOMES e GRIGOLETTI, 2004).

FIGURA 6 – ASPECTOS PATOLÓGICOS DO FUNGO *Armillaria* sp. EM *Pinus*



FONTE: AUER, GOMES e GRIGOLETTI, 2004. ADAPTADO.

A predisposição a esta patologia pode ocorrer devido a fatores bióticos ou abióticos, pois a interação e mudança química na planta leva a facilidade da colonização pelo fungo e dependendo da intensidade da doença, ocorre a morte da planta. No Brasil autores citam os primeiros registros desse patógeno no Sul do país (SILVA, 2014).

Citada em 2016 pela British Broadcasting Corporation (BBC), a *Armillaria* possui diversas espécies diferentes e ampla distribuição mundial (BBC, 2016). Como exemplo de espécies conhecidas pode-se citar *A. mellea*, *A. puiggarii*, *A. procera*, *A. limonea* e *A. novazelandiae* (SILVA, 2014). Há registro por autores como Kobori et al., (2013) sobre o uso medicinal e comestível de algumas espécies desse fungo.

Estudos apontam que a infecção por este patógeno em outras plantas leva a deformidades de corpos frutíferos o que leva os autores a afirmarem a presença de um potencial alelopático devido ao isolamento e consequentes testes com substâncias como o armillariol A e C (KOBORI et al., 2013). Outros estudos apontam a produção de enzimas de degradação como a manganês peroxidase, lignina peroxidase e a lacase, sendo o fungo capaz de degradar compostos como o naftaleno, por exemplo (HADIBARATA et al., 2011).

Compostos como ésteres de aril sesquiterpeno de protoiludano foram isolados a partir de Cogumelos *Armillaria* e *Clitocybe illudens*, demonstrando atividades biológicas como antimicrobiana e citotoxicidade

contra células cancerígenas (KOBORI et al., 2013).

2.6 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea pertence ao gênero Botryotinia, da ordem Helotiales, classe Leotiomycetes e família Sclerotiniaceae. É um fungo patogênico e necrotrófico, capaz de acometer mais de 200 gêneros de plantas. Esse fungo é o agente causador da doença conhecida popularmente como mofo-cinzento, podendo ser destrutivo em sistemas em culturas de roseira, morango, tomate, crisântemo e eucalipto quando atacadas por esse patógeno (Figura 7) (COSTA, 2014).

FIGURA 7 – INFECÇÃO POR *Botrytis cinerea* EM ACÍCULAS DE *Pinus*



FONTE: KAPITOLA, 2000. ADAPTADO.

Todas as partes da planta, frutos, hastes, folhas e flores são suscetíveis ao patógeno; a infecção geralmente inicia-se durante a época de florescimento, onde conídios do fungo contaminam o tecido causando uma infecção latente que aparecerá após o amadurecimento do fruto. Devido ao fato de causar podridão em culturas agrícolas e florestais, esse fungo promove perdas econômicas. Alguns estudos tem se voltado para a pesquisa de compostos como as quitinases, que suprimem a proliferação deste fungo, já que o uso inadequado de fungicidas leva à resistência entre patógenos fúngicos (SILVA, 2014). Essa resistência está associada geralmente a mutações no gene succinato desidrogenase (SDH) como se constata no estudo de Samara, Madesis e Karaoglanidis (2016).

Outros estudos apontam a produção de substâncias pelo *B. cinerea* como o ácido abscísico (ABA), que desempenha um papel importante na resistência ao estresse. Essa substância também é capaz de regular a ativação de células imunes inatas e homeostase de glicose em mamíferos, sendo de extrema importância em aplicações na área agrícola e farmacêutica (DING et al., 2016). Este patógeno também é capaz de produzir fitotoxinas como o botrydial que estariam possivelmente envolvidas na patogenicidade do fungo (PORQUIER et al., 2016).

O *Botrytis cinerea* cresce abundantemente em restos de cultura na superfície do solo, sendo que a produção de conídios se dá em temperaturas acima de 12 °C e alta umidade relativa. A infecção a partir dos conídios e o crescimento do patógeno ocorre em temperatura superior a 10 °C (COSTA, 2014).

2.7 *Diplodia pinea*

Diplodia pinea (syn. *Sphaeropsis sapinea*) é um fungo patogênico pertencente ao filo Ascomycota, ordem Botryosphaerales, classe Dothideomycetes, família Botryosphaeriaceae, onde seus esporos assexuais ou conídios desenvolvem-se dentro de picnídios. Os conídios tem forma oblonga para clavado com extremidades basais contundentes, ápices arredondados e desenvolvimento monoblástico via proliferação percorrente das células conidiogênicas. Desde sua primeira descrição como *Sphaeria pinea* em 1842, foi renomeado pelo menos 10 vezes, sendo que o nome mais comum é *Diplodia pinea* (BASILIO, 2013).

O *D. pinea* é conhecido como um patógeno que atinge o *Pinus*, encontrado em todos os países onde há presença desta espécie de planta lenhosa. Este fungo pode sobreviver como endofítico ou saprofítico e está presente em tecido vivo ou morto das acículas, caules e ramos. Como saprófita pode ficar na planta por muitos anos e não desenvolver a doença. Existem diferenças da suscetibilidade do *Pinus* ao fungo sendo o *Pinus nigra* considerado o mais suscetível (BASILIO, 2013).

Ocorre em regiões temperadas semitropical e tropical e é transmitido pela semente, resultando na podridão de semente, redução de germinação,

deterioração de radículas emergentes e tombamento de plântulas. Os efeitos mais agressivos do fungo estão ligados a períodos de estresse da planta, dentre os fatores podem-se citar temperatura adversa, seca ou alguma lesão na planta. Nos tecidos infectados o *D. pinea* forma corpos de frutificação. Posteriormente esses ditos picnídios amadurecem e liberam conídios que são disseminados pelo vento ou chuva. Posteriormente a infecção se estabelece entrando nos brotos jovens que cessam o seu crescimento e morrem. Após dois ou três anos de infecção sucessiva os topos das árvores ficam totalmente danificados levando ao aparecimento dos sintomas da patologia. Como sintomas pode-se citar a necrose, seca e quebra dos ponteiros e o declínio, sendo que o fungo ainda pode induzir a formação de cancrios, morte de raízes e murcha da copa (figura 8). Atualmente as condições mais viáveis de controle da doença é o cultivo de variedade de plantas resistentes, melhor qualidade das mudas e irradiação por UV (CHOU, 1978; BASILIO, 2013 e REGLINSKI et al., 2013).

FIGURA 8 – ASPECTOS PATOLÓGICOS DO FUNGO *Diplodia pinea*



FONTE: LINALDEDDU, HASNAOUI e FRANCESCHINI, 2008; STANOSZ e DAUGHTREY, 2011. ADAPTADO.

Basilio (2013) em seu estudo cita que existem dois grupos morfologicamente distintos, havendo uma variante dos tipos A e C deste

fungo. Sua diferenciação é baseada na dimensão e morfologia da parede dos conídios, aspecto e taxa de crescimento micelial (MADAR et al., 1995).

Dentre as substâncias já isoladas descritas na literatura podem-se citar os estudos de Wada e Ishida (1976; 1979) citam a elucidação estrutural de quatro lactonas de dez membros, que possuem como atividade a inibição de hidroxilases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS UTILIZADOS

- Autoclave vertical SD Phoenix®;
- Balança analítica;
- Banho termostatzado quimis 1062®;
- Bastão de vidro;
- BOD (estufa incubadora microbiológica – Incubadora BOD com fotoperíodo SL 224 SOLAB®);
- Cadinhos de porcelana;
- Cálice de vidro;
- Centrífuga;
- Controles (DMSO, rutina, saponina, Triton, TTC, vitamina C,)
- Copo de Béquer;
- Cromatoplasas de sílica gel Whatman®;
- Eppendorfs;
- Equipamento Bench Top Pro sp-scientific®;
- Equipamento MERCK HITACHI Elite Lachrom, com detector DAD L-2450, leitura na faixa de 220 a 400 nm, injetor manual, com coluna cromatográfica XTerra® RP18 5µm (4,6x250mm);
- Equipamento UDK 139 Semi Automatic Destillation Unit – VELP Scientifica®;
- Espectrofotômetro marca Multiskan FC Thermo Scientific®;
- Estufa Fanem®;
- Erlenmeyer;
- Extrator Soxhlet;
- Freezer Brastemp®;
- Fita de pH;
- Fluxo laminar Airstream®;
- Fluxo laminar Labconco purifier class II total exhaust®;
- Frascos de vidro;
- Funil de separação;

- Hipoclorito de sódio;
- Infravermelho Nicolet iS10 Thermo scientific®;
- Lupa Motic®;
- Meios de cultura: BD (infusão de batata e dextrose), Czapek, Malte (extrato de malte), Mueller-Hinton, RPMI 1640;
- Micropipetas automáticas (10 a 1000µL⁻¹);
- Microscópio óptico Leica DME®;
- Mufla Linn Elektro Therm®;
- pHmetro MS TECNOPON mPA210®;
- Papel de filtro Whatman (nº1),;
- Pipetas graduadas e volumétricas (1, 2, 5, 10 e 20mL);
- Placas de ágar sangue;
- Placas de Petri;
- Reagentes (2,4 dinitrofenil-hidrazina, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, amônia, cloreto de alumínio, cloreto férrico, difenolboriloxietilamino a 1% em metanol, floroglucina clorídrica, lugol, Reagente de Bradford, Reativo de Dragendorff, Reagente de Schiff-PAS, tetraiodeto bismuto de potássio, vanilina);
- Rotaevaporador;
- Sangue de carneiro;
- Solução de água do mar artificial com 38g de sal marinho obtido comercialmente - marca Blue Greasure®;
- Soluções (catalizador de CuSO₄ e K₂SO₄, NaOH, ácido oxálico, permanganato de potássio, Na₂CO₃. SDS, salina, DPPH, Folin-Ciocalteau, fosfato de sódio, molibdato de amônio);
- Solventes (acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico, água, clorofórmio, etanol, éter etílico, hexano, metanol, tolueno);
- Sonicador UltraCleaner 1400®.

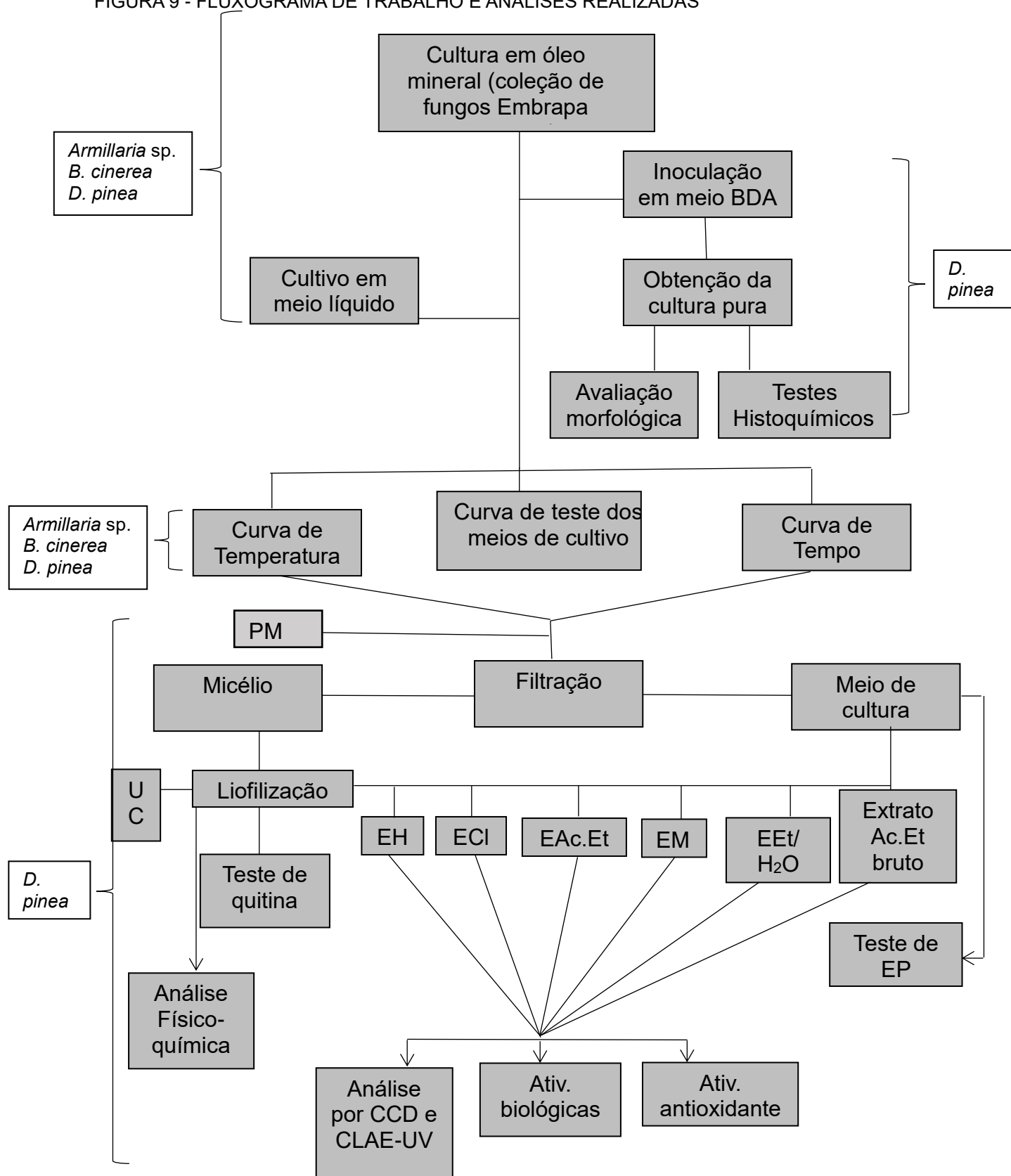
3.2 METODOLOGIAS

O presente trabalho faz parte do projeto Capes/Embrapa número 015/2014 intitulado “Aspectos de cultivo e abordagem química de fungos patogênicos e micorrízicos de *Pinus* sp. e sua aplicação na área farmacêutica, veterinária e agrícola”. Por se tratar de um projeto com mais pesquisadores parte do estudo foi realizado com três fungos patogênicos e parte realizado somente com o fungo *Diplodia pinea*, o trabalho foi realizado conforme descrito na figura 9.

Todos os fungos foram previamente isolados de *Pinus taeda* sendo que foram utilizados a *Armillaria* sp. isolado denominado A2 retirado da casca do tronco, coletado em Piraí do Sul-PR; *Botrytis cinerea* (sem código) retirado de muda jovem, coletado em Guarapuava-PR e *Diplodia pinea* isolado denominado DP-6/SJO retirado de ponteiros de árvores, coletado em São José do Ouro-RS.

Os fungos fitopatogênicos foram obtidos a partir da Coleção de Fungos Fitopatogênicos Florestais da Embrapa Florestas, Laboratório de Patologia Florestal, localizado na Estrada da Ribeira em Colombo Paraná. Todos os fungos tiveram uma amostra depositada no herbário UNOP da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) tendo os números de exsicata UNOP 4240, UNOP 4241 e UNOP 4242 para os fungos *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*, respectivamente. Foi obtida a autorização do CGEN para a pesquisa com estes patógenos. Os fungos foram mantidos em sala com temperatura controlada de 18 °C, preservados em tubos de ensaio contendo óleo mineral.

FIGURA 9 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO E ANÁLISES REALIZADAS



NOTA: (1) **A:** PM – Produção em Massa. **B:** UC- Umidade e Cinzas. **C:** EP- Exopolissacarídeos.

FONTE: O autor (2017)

3.2.1 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS *Amillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*

Para a obtenção das culturas puras, em fluxo laminar os fungos foram retirados do óleo mineral, com auxílio de alça bacteriológica, previamente flambada, e inoculados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA) Himedia® (Infusão de Batata – 200g/L; Dextrose - 20g/L; Ágar - 15g/L; Água destilada q.s.p/1L). As placas de Petri foram incubadas em BOD (estufa incubadora microbiológica – Incubadora BOD com fotoperíodo SL 224 SOLAB®) a 24 °C com fotoperíodo desligado de 7 a 15 dias para obtenção dos fungos puros em placa.

As amostras de micélio dos fungos fitopatogênicos, em triplicata, foram montadas em lâminas de vidro, cobertas com lamínulas de mesmo material, foram posteriormente coradas com azul de metileno e examinadas em microscópio óptico Leica DME® em aumentos de 100x e 400x quanto a sua morfologia, em lupa Motic® e a olho nu. Também foi avaliado o aspecto morfológico de cada fungo em meio de cultivo líquido BD. A avaliação morfológica foi realizada no laboratório de Patologia florestal da Embrapa Florestas.

3.2.2 CULTIVO E SELEÇÃO DO MEIO LÍQUIDO PARA OS FUNGOS *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*

Os meios de cultura são utilizados ao nível laboratorial com a finalidade de fornecer nutrientes para o cultivo de microorganismos. Podem ser sólidos, semissólidos ou líquidos e são classificados como enriquecidos, seletivos, diferenciais e de manutenção (SP LABOR®, 2016).

Os meios enriquecidos são indicados para microorganismos em geral por possuírem em sua composição uma quantidade grande de nutrientes. Os meios seletivos possuem algum agente que restringe o crescimento de determinado microorganismo. Os meios diferenciais apresentam substâncias que estabelecem diferenças entre estes e os meios

de manutenção viabilizam a conservação dos microorganismos (SP LABOR®, 2016).

Como características particulares o meio BD apresenta-se como um pó fino de coloração bege, tendo como fonte de carboidratos a batata e a dextrose. É citado como um meio para cultivo de leveduras, bolores e fungos em geral. Não apresenta seletividade, nem sais, nem fontes de nitrogênio em sua composição. Pode ser enriquecido com antibióticos ou ácidos para inibir o crescimento de bactérias (ACUMEDIA® e KASVI®, 2016).

O meio malte é um pó fino de coloração bege intensa que apresenta acentuada higroscopicidade. É um meio que fornece carbono, proteínas e nutrientes para o isolamento e cultivo de leveduras, bolores e fungos. Tendo como fonte de carboidratos o extrato de cevada maltada solúvel em água clarificada. Este é um ingrediente útil em meios desenvolvidos para a propagação de fungos (ACUMEDIA® e SP LABOR®, 2016).

O meio de cultura Czapek é indicado no crescimento de microorganismos que são capazes de utilizar o nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Composto por sais como o sulfato ferroso e tem como fonte de carbono a sacarose (KASVI®, 2016).

O cultivo dos fungos patogênicos foi realizado no laboratório de Patologia florestal da Embrapa Florestas e de Farmacotécnica da UFPR. Foram testados três meios de cultura líquidos de composição diferente: BD (infusão de batata e dextrose), MALTE (extrato de malte) e CZAPEK, de composição informada no quadro 2. Ao final do cultivo foi avaliada a produção de biomassa seca. Para o preparo dos meios de cultivo BD, MALTE e CZAPEK foram pesadas, em balança analítica, as quantidades de 24g.L^{-1} , 20g.L^{-1} e $34,5\text{g.L}^{-1}$, respectivamente.

Em frascos de vidro com tampa de plástico contendo um tampão de algodão, com capacidade de 500 mL, colocou-se uma alíquota de 100mL de cada meio, os quais foram esterilizados em autoclave vertical SD Phoenix® a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 atm, por 40 minutos de acordo com Silva (2014) com modificações.

QUADRO 2 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Meio	Constituintes	Quantidade
BD ¹	Infusão de Batata	200,0 g
	Dextrose ^a /Glicose ^b	20,0 g
	Água ultrapurificada	1000 mL
	q.s.p pH	5,1
MALTE ²	Extrato de malte	17,0 g
	Peptona micológica	3,0 g
	Água ultrapurificada	1000 mL
	q.s.p pH	5,4
CZAPEK ³	Sacarose	30 g
	Nitrato de Sódio	2 g
	Fosfato dibásico de potássio	1 g
	Sulfato de magnésio	0,5 g
	Cloreto de potássio	1 g
	Sulfato ferroso	0,01 g
	Água ultrapurificada	1000 mL
	q.s.p pH	7,3

FONTE: 1. HIMEDIA^a®; KASVI^b® (2016); 2. HIMEDIA® (2016); 3. TUIE, J (1969)

Na inoculação, em cada frasco, em fluxo laminar Airstream®, foram depositados dois discos de micélio ágar de cinco mm (padronizados com furador, previamente flambado) retirados da cultura pura de cada um dos fungos crescida em meio BDA. Os frascos foram incubados em BOD de 20 °C fotoperíodo desligado por 35 dias (*Armillaria* sp.; *Diplodia pinea*) e BOD em 12 °C (*Botrytis cinerea*) com fotoperíodo desligado por 35 dias, em repouso. Após esse período, o meio de cultivo foi separado do micélio por filtração em fluxo laminar Labconco purifier class II total exhaust®. A massa fúngica foi seca em estufa Fanem® a 40 °C por 72 horas, em placas de Petri previamente pesadas. Após esse período e resfriamento das placas até a

temperatura ambiente em dessecador, obteve-se o rendimento para a produção em cada meio de cultura por diferença de peso.

Os meios foram acondicionados em frascos de vidro e congelados em freezer Brastemp® por no mínimo 72hrs. Posteriormente, foram descongelados em banho termostatzado quimis 1062® a 70 °C, sendo concentrados em estufa a 40 °C, até o volume de 100 mL. Por fim, em funil de separação, foi realizado o particionamento com acetato de etila obtendo-se o extrato acetato de etila bruto. A massa fúngica, após seca foi macerada por 72 hs em metanol, sendo que a cada 24 hs a massa foi filtrada e o solvente trocado, obtendo-se o extrato metanólico bruto.

3.2.3 CURVA DE TEMPERATURA DE *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*

O experimento foi realizado visando aperfeiçoar a produção em massa e padronizar a melhor temperatura de crescimento para cada um dos fungos patogênicos. Os testes foram realizados no laboratório de Patologia florestal da Embrapa Florestas e de Farmacotécnica da UFPR.

O estudo da temperatura de crescimento foi feito com 100mL de meio BD em frascos com capacidade de 500mL. Em cada frasco foi adicionado 2,4 g de meio BD e 100 mL de água ultra pura e posteriormente autoclavados a 121 °C a 1 atm, por 40 minutos. Após o resfriamento do meio a temperatura ambiente, 2 discos de micélio ágar de 5 mm (que foram retirados de cultura pura, de cada um dos fungos, crescida em meio BDA) foram transferidas para o meio liquido com auxílio de um furador previamente flambado. Posteriormente, os frascos foram incubados em BOD com fotoperíodo desligado, em repouso, por 35 dias, de acordo com a metodologia de Silva (2014), com modificações.

Para o fungo *Diplodia pinea* foram feitos 10 frascos de vidro para cada uma das seguintes temperaturas: 12 °C, 16 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C e 32 °C, para o *Botrytis cinerea* frascos foram incubados nas temperaturas de 8 °C, 12 °C, 16 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C e 32 °C (alíquotas de 10 frascos para cada faixa de temperatura) e para a *Armillaria* sp. foram feitos 10 frascos

para cada uma das seguintes temperaturas: 8 °C, 12 °C, 16 °C, 20 °C e 24 °C. Essas temperaturas foram escolhidas levando em consideração características particulares de cada fungo testado (quadro 3).

Após o período de incubação, os frascos foram retirados das BODs, e o conteúdo filtrado em fluxo laminar separando-se a massa do meio de cultivo. A massa fúngica obtida foi transferida para placas de Petri, previamente pesadas, e estas foram posteriormente levadas a estufa a 40 °C por 72 horas. Após este período, as placas foram acondicionadas em dessecador até temperatura ambiente e em seguida pesadas, para obtenção da massa fúngica.

QUADRO 3 – CINÉTICA DE TEMPERATURA PARA OS FUNGOS TESTADOS

FUNGO	TEMPERATURAS
<i>Armillaria</i> sp.	8 °C, 12 °C, 16 °C, 20 °C e 24 °C
<i>Botrytis cinerea</i>	8 °C, 12 °C, 16 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C e 32 °C
<i>Diplodia pinea</i>	12 °C, 16 °C, 20 °C, 24 °C, 28 °C e 32 °C

FONTE: O autor, 2017

3.2.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA AO LONGO DO TEMPO DE *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*

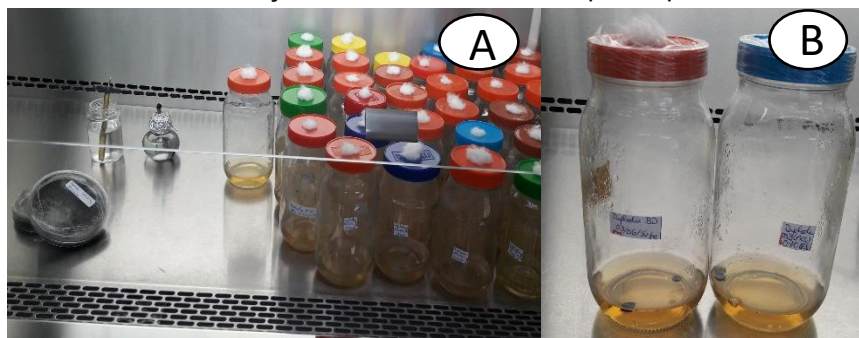
A avaliação de produção de diferentes metabólitos e maior produção micelial foi realizada por meio de uma curva de tempo. Retirada de uma cultura pura do fungo testado, 2 discos de micélio ágar foram transferidos para um frasco de vidro, com o auxílio de um furador previamente flambado e esterilizado, contendo 100 mL de meio BD. Os frascos foram incubados em BOD a 20 °C com fotoperíodo desligado e em repouso. A cada sete dias, 10 frascos foram retirados da BOD, sendo os tempos de retirada 7, 14, 21, 28 e 35 dias. Após a retirada de cada alíquota, a massa fúngica foi filtrada em fluxo laminar, separando-se o meio de cultivo e o micélio. O caldo foi concentrado em estufa a 40 °C até a redução do seu volume para 100 mL, para posterior extração por particionamento com acetato de etila. A massa

fúngica foi transferida para placas de Petri previamente pesadas e secas em estufa a 40 °C por 72 horas. Transcorrido este tempo as placas foram transferidas para dessecador até temperatura constante e pesadas. Posteriormente o micélio foi liofilizado em equipamento Bench Top Pro sp-scientific®, por 5 dias a - 80 °C e triturado, sendo que a partir deste foi obtido o extrato metanólico bruto por maceração a frio por 72 horas. O experimento foi realizado no laboratório de Patologia florestal da Embrapa Florestas, de Farmacotécnica e Fitoquímica da UFPR.

3.2.5 PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA DE *Diplodia pinea*

A produção de biomassa fúngica foi realizada empregando o cultivo em meio líquido com as condições otimizadas de temperatura, tempo e meio, para maior produção em gramas de micélio. Este experimento foi realizado no laboratório de Patologia florestal da Embrapa Florestas e de Farmacotécnica da UFPR.

Foram utilizados frascos de vidro com tampa de plástico e tampão de algodão, contendo 50 mL do meio BD previamente autoclavado por 40 minutos a 121 °C. Inoculou-se em fluxo laminar, dois discos de micélio ágar retirados da cultura pura crescida em BDA, com furador de cinco mm previamente flambado. Os frascos foram mantidos em BOD (estufa DBO Caltech®) a 20 °C com fotoperíodo desligado por 21 dias (Figura 10). Posteriormente, o micélio foi separado do meio de cultivo sendo este congelado em freezer e liofilizado por cinco dias. O meio foi concentrado em estufa a 40 °C e utilizado na obtenção do extrato acetato de etila bruto.

FIGURA 10 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Diplodia pinea*

NOTA: (1) **A:** FRASCOS CONTENDO MEIO LÍQUIDO AUTOCLAVADO. **B:** DISCOS DE MICÉLIO INOCULADO EM MEIO DE CULTIVO.

FONTE: O autor (2017)

3.2.6 PRODUÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE *Diplodia pinea*

A extração com metanol foi realizada com o micélio liofilizado de 10 frascos de cultivo da melhor temperatura de crescimento. Adicionou-se quantidade suficiente de metanol para macerar a massa em gramas obtida após a liofilização sendo esta calculada na proporção de 1:9 m/V de metanol. A mistura micélio e metanol foi deixada em repouso sendo filtrada a cada 24 horas. O solvente recolhido da filtração foi armazenado em frasco de vidro e ao micélio foi adicionado a mesma quantidade de metanol já descrita, esse processo foi repetido por três dias. Ao fim da extração o micélio foi desprezado e o solvente usado no processo extrativo foi seco em banho termostático a 40 °C sendo obtido o extrato metanólico bruto (TONIAL, 2014). O experimento foi realizado no laboratório de Farmacotécnica UFPR.

3.2.7 PRODUÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA BRUTO DO CALDO DE CULTIVO DE *Diplodia pinea*

O extrato acetato de etila foi obtido pela técnica de particionamento empregando-se funil de separação. Inicialmente o meio de cultivo foi concentrado em estufa a 40 °C até o volume ser reduzido a 100 mL. Em funil de separação, foram realizadas sucessivas extrações utilizando 150 mL de solvente por vez, até obtenção de um extrato límpido. Em metodologia

adaptada, este foi concentrado em rotaevaporador e levado ao banho maria até secura (GUIMARÃES, 2006, adaptado).

3.2.8 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS EXTRATOS DE *Diplodia pinea* POR SOXHLET

A obtenção dos extratos foi realizada utilizando o equipamento extrator Soxhlet. Partindo do fungo liofilizado, a extração foi realizada com solventes orgânicos de diferentes polaridades, para extração de compostos secundários de diferentes classes químicas. Foram utilizados os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e uma mistura 50% etanol/50% água destilada (1:1).

3.2.9 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A CCD é uma técnica de separação que compreende uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária consistiu em cromatoplas de sílica gel Whatman®, de 3,5 cm de largura por 6 cm de comprimento (MIGUEL, 2003). As amostras foram aplicadas sobre a cromatoplasa com o auxílio de um capilar e submetidos à eluição por meio das fases móveis descritos no quadro 4, conforme interesse:

QUADRO 4 – FASE MÓVEL E REVELADORES UTILIZADOS NA CCD

Constituinte químico	Fase móvel	Revelador	Metodologia
Esteroides e Triterpenos	Tolueno:Acetato de etila (93:7)	Vanilina 1%:ácido sulfúrico (1:1)	Wagner, 1996
Flavonoides	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Reativo de NEU ^A	Wagner, 1996
Taninos e Polifenóis	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Cloreto férrico	Wagner, 1996
Alcaloides	Clorofórmio:metanol (95:5) universo amônio	Dragendorf ^B	Valente et.al, 2006

NOTA: (1) **A:** DIFENOLBORILOXIETILAMINO A 1% EM METANOL. **B:** TETRAIODETO BISMUTO DE POTÁSSIO

FONTE: O autor (2017)

Foram testados por CCD os extratos metanólico bruto das amostras dos três fungos de patogênicos, as amostras obtidas por extração utilizando Soxhlet das curvas de temperatura, tempo e meio de cultura e para o controle dos meios.

O controle dos meios de cultura foi realizado para os três meios de cultivo empregados, BD, Czapek e Malte. A metodologia de preparo, autoclavagem e incubação, foram as mesmas realizadas para o cultivo dos fungos. Foram realizadas extrações por particionamento com acetato de etila em funil de separação e análise de CCD para a padronização. As análises foram realizadas no laboratório de Fitoquímica da UFPR.

3.2.10 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV)

A complexidade na determinação de compostos tem demandado técnicas cada vez mais específicas de identificação. Muitos compostos

encontram-se como misturas homogêneas de diferentes substâncias, o que dificulta a análise da amostra sendo muitas vezes necessária a utilização de técnicas de separação para a identificação dos constituintes presentes na amostra. A cromatografia é um método físico-químico de separação em que os constituintes da amostra são particionados em duas fases, uma estacionária e outra um fluido insolúvel que percola pela primeira (SILVA, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência utiliza pequenas colunas nas quais são eluídas a fase móvel e a amostra, essa técnica tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, sendo que, alguns aparelhos trazem uma biblioteca interna para a comparação dos compostos encontrados. Neste estudo foi empregada a cromatografia de fase reversa em que a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, sendo assim, os compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente (SILVA, 2012).

As análises em CLAE-UV foram realizadas no laboratório de Fitoquímica da UFPR, utilizando equipamento MERCK HITACHI Elite Lachrom, com detector DAD L-2450, leitura na faixa de 220 a 400 nm, injetor manual, com coluna cromatográfica XTerra® RP18 5µm (4,6x250mm). Para as análises foi utilizado o método geral na qual são empregados os solventes metanol (100%) e fase ácida (ácido fosfórico, ácido sulfúrico, água 0,1M). O modo de análise foi por gradiente, como disposto no quadro 5, com fluxo de 1 mL/min. As corridas duraram 46 minutos para cada amostra, sendo que 20 µL da mesma foi injetada no equipamento. A temperatura durante o ensaio foi de 20°C.

QUADRO 5 – MÉTODO POR GRADIENTE EMPREGADO NAS ANÁLISES

Tempo (min)	Metanol %	Fase ácida %	Fluxo (mL/min)
0,0	20,0	80,0	1,000
3,0	20,0	80,0	1,000
35,0	100,0	0,0	1,000
40,0	100,0	0,0	1,000
43,0	20,0	0,0	1,000

FONTE: O autor (2017)

O controle dos meios de cultura foi realizado para os três meios de cultivo empregados, BD, Czapek e Malte. A metodologia de preparo, autoclavagem e incubação, foram realizadas sob as mesmas condições padronizadas para o cultivo dos fungos. Foram realizadas extrações por particionamento com acetato de etila em funil de separação e análise de CLAE-UV para a padronização.

3.2.11 TESTES HISTOQUÍMICOS PARA O FUNGO *Diplodia pinea*

A histoquímica é uma técnica de identificação de grupos químicos em tecidos vegetais e fúngicos, estando associada a aspectos químicos, histologia e localização desses grupos de compostos. Utilizam-se, de modo geral, corantes biológicos, que podem ser incolores, inorgânicos ou orgânicos. Estes reagem com estruturas celulares. Ocorre uma reação com o corante para identificar determinada substância específica que é detectada por observação no microscópio (FIGUEIREDO et al., 2007). Estes testes contribuem para auxiliar cada vez mais os estudos sobre o metabolismo secundário e a identificação de substâncias possivelmente produzidas pelo fungo.

Para a realização dos testes histoquímicos foram utilizadas as técnicas qualitativas de coloração empregadas na anatomia vegetal (quadro 6). O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA incubadas em BOD a 24 °C, por 30 dias. Amostras de micélio em triplicata foram coletadas das placas e montadas em lâminas, coradas e examinadas em microscopia óptica em aumentos de 100x e 400x, para a detecção das

substâncias de interesse. As análises foram realizadas no Departamento de Ciências Biológicas da UFPR.

QUADRO 6 - REAGENTES E CONSTITUINTES QUÍMICOS UTILIZADOS NOS TESTES HISTOQUÍMICOS

Reagente	Constituinte Químico	Coloração Esperada
Cloreto de Alumínio	Flavonoides	Amarela escura
Floroglucina clorídrica	Lignina	Avermelhada
Cloreto férrico	Compostos fenólicos	Azulada
Lugol	Amido	Enegrecida
2,4 dinitrofenil-hidrazina	Terpenoides com grupo carbonila	Alaranjada
Reagente de Schiff-PAS	Polissacarídeos neutros	Rosa escura
Reativo de Dragendorff	Alcaloides	Marrom
Reagente de Bradford	Proteínas totais	Azulada

FONTE: FIGUEIREDO et al., 2007.

3.2.12 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA BIOMASSA DE *Diplodia pinea*

As análises físico-químicas foram realizadas todas em triplicata com amostras do fungo liofilizado, nos laboratórios de Farmacotécnica, laboratório de Bromatologia e Departamento de Nutrição da UFPR. As determinações foram:

3.2.12.1 Determinação do teor de umidade

As análises de umidade e cinzas são úteis para controle de qualidade da amostra e indicações de impurezas na mesma (BRASIL, 2010). A umidade foi determinada utilizando a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 5ª edição de 2010 com modificações. Inicialmente os cadinhos

devidamente identificados foram submetidos à secagem em estufa a 100 °C, por cerca de 2 horas, transferidos ao dessecador até temperatura ambiente e pesados. Aproximadamente 3 g de amostra foram pesadas dentro do cadinho e este colocado em estufa na temperatura de 105 °C por 3 horas. Seguiu-se com a pesagem até obtenção de massa constante.

Os cálculos foram realizados utilizando a fórmula abaixo:

$$\frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Onde P_a = Peso da amostra, P_u peso da amostra + cadinho antes da dessecação e P_s = peso do cadinho + amostra após a dessecação.

3.2.12.2 Determinação do teor de cinzas

Essa análise foi realizada com amostras do fungo liofilizado e teve como finalidade, estabelecer de maneira quantitativa as substâncias residuais não voláteis utilizando o processo de incineração.

A metodologia empregada foi a da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (BRASIL, 2010). A amostra foi pesada em cadinho padronizado e de massa conhecido (seco em estufa e resfriado em dessecador). Estes foram levados à mufla Linn Elektro Therm®, por 6 horas a 660 °C, para incineração até a eliminação da matéria orgânica. Posteriormente foram resfriados em dessecador e pesados novamente. Os cálculos foram realizados empregando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{cinzas por cento m/m}$$

Onde N = nº de g de cinzas e P = nº de g da amostra

3.2.12.3 Determinação do potencial hidrogeniônico

Nesse experimento o pH foi determinado utilizando metodologia do Instituto Adolfo Lutz descrita em 1985. O pH do fungo foi medido com

aparelho MS TECNOPON mPA210®, previamente calibrado com os tampões 4,0 e 7,0, com porcentagem de confiabilidade de 99,8%. Dez gramas de biomassa liofilizada previamente homogeneizada foram diluídas em 100 mL de água destilada. A análise foi realizada com amostras em triplicata e o valor expresso foi a média aritmética do resultado obtido.

3.2.12.4 Determinação de proteínas totais

Para determinação de proteínas a metodologia empregada foi a da *Association of Official Analytical chemists* (AOAC, 2005). Inicialmente 1 g da biomassa liofilizada, em triplicata, foi submetida à reação de digestão com ácido sulfúrico e catalizador de CuSO_4 e K_2SO_4 , para a formação de sulfato amoniacal no equipamento DK 20 Heating Digester – VELP Scientifica®. Em seguida, a amostra foi destilada por arraste de vapor de amônia no equipamento UDK 139 Semi Automatic Distillation Unit – VELP Scientifica®, sendo depositada em frasco de Erlenmeyer contendo ácido bórico 4%. Por fim, a amônia destilada foi titulada com ácido sulfúrico 0,1N até alteração da cor verde para rosa. O cálculo de porcentagem das proteínas foi realizado seguindo a fórmula:

$$\% \text{ de proteínas} = \frac{V \times 0,14 \times f}{P}$$

Onde V = volume de ácido sulfúrico gasto na titulação, P = peso da amostra, F = fator de conversão (6,25).

3.2.12.5 Determinação de fibras brutas

A determinação de fibras brutas foi realizada segundo metodologia padronizada pelo Instituto Adolf Lutz 1985, sendo a análise realizada em triplicata. Cerca de 1g da amostra de biomassa liofilizada foi pesada em balança analítica, sendo transferido para um Erlenmeyer de 500 mL para que fosse realizada a digestão ácida. À amostra de biomassa foi adicionado 200 mL de uma solução 0,255 N de ácido sulfúrico (1,25% a quente). O frasco de Erlenmeyer foi então levado à chapa aquecedora por 30 minutos a partir da fervura. Posteriormente a mistura foi filtrada em pano resistente e

lavado com água destilada fervida para neutralizar o resíduo, isso foi repetido até obtenção de pH neutro, sendo este medido com fita de pH.

O precipitado foi transferido para outro Erlenmeyer de 500 mL e a este adicionou-se uma solução 0,313 N de hidróxido de sódio (1,25% a quente). Este foi novamente colocado em chapa aquecedora por 30 minutos contados a partir da fervura. A mistura foi então filtrada com auxílio de cadinho de Gooch de peso conhecido. Três gotas de ácido nítrico concentrado foram gotejadas sobre o precipitado no cadinho, este foi colocado em mufla a 500°C, até a formação de cinzas. Posteriormente, foi transferido para um dessecador até resfriamento e novamente pesado. O teor de fibras totais foi calculado pela fórmula representada a abaixo, sendo calculada a média e o desvio padrão das amostras.

$$FB (\%) = \frac{\text{massa do resíduo (g)} - \text{massa das cinzas (g)}}{\text{massa da amostra (g)}} \times 100$$

3.2.12.6 Determinação do teor de lipídeos

O teor de lipídios foi determinado pelo método de extração em Soxhlet utilizando a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985) com modificações, onde foram pesados 3 g da amostra liofilizada em triplicata, transferindo-se a mesma para cartucho de papel de filtro. As alíquotas foram levadas ao Soxhlet, acoplado a um balão de fundo chato previamente seco e tarado. O solvente de extração utilizado foi o éter etílico em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. O sistema foi mantido sob aquecimento em banho termostaticado sendo a extração realizada continuamente por 8 horas. Decorrido este tempo o balão foi levado à estufa (temperatura 105°C) por 1 hora, resfriado e pesado, repetindo-se a secagem em estufa por 30 minutos até obtenção de peso constante. O cálculo empregado está descrito abaixo:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{lipídio por cento m/m}$$

Onde N= nº de gramas de lipídio, P = nº de gramas da amostra

3.2.13 DETERMINAÇÃO DE QUITINA EM *Diplodia pinea*

A pesquisa de quitina foi realizada em triplicata. Inicialmente pesou-se 3 g da biomassa liofilizada, este foi transferido para um copo de béquer, adicionando-se 75 mL de água destilada. A mistura foi sonicada por 40 minutos em sonificador UltraCleaner 1400®, sendo posteriormente filtrada. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 75 mL de etanol PA por 24 horas. Posteriormente foi realizada uma etapa de desproteíntização em que utilizou-se NaOH 4 M 1:20 (m/V). Essa solução foi adicionada ao precipitado e levado ao banho termostático por 2 horas a 100 °C, sendo que este processo foi repetido 3 vezes. A suspensão obtida foi filtrada e o precipitado lavado com água destilada até obtenção de pH neutro, que foi identificado empregando-se fita indicadora de pH.

Posteriormente a este foi adicionado 75 mL de uma solução de permanganato de potássio 10 g/L que permaneceu em contato com o precipitado por uma hora, este foi então filtrado e a ele adicionado uma solução de ácido oxálico 10 g/L por mais uma hora, para completar a etapa de descolorificação.

Após essa etapa a mistura foi filtrada e o precipitado depositado em uma placa de Petri de peso conhecido que foi colocada em estufa a 50 °C até obtenção de peso constante. O produto final foi analisado por infravermelho Nicolet iS10 Thermo scientific®, sendo que os picos característicos para presença de quitina foram comparados com dados da literatura (ÁLVAREZ, et al., 2014 com modificações).

3.2.14 PESQUISA DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM *Diplodia pinea*

Os polissacarídeos podem ser definidos como polímeros contendo várias unidades monossacarídicas ligados por ligações glicosídicas. Podem ser Lineares ou Ramificados e são classificados como homo ou hetero polissacarídeos. Tem funções importantes como reserva e suporte estrutural. Como exemplos podem-se citar a celulose, quitina e glicogênio. Apresentam uma imensa aplicabilidade e grande interesse econômico, dentre as

aplicações citamos as na indústria de alimentos, biomédicas, farmacêutica e de cosméticos. Os exopolissacarídeos são polissacarídeos liberados no meio para o meio externo e entre os produtores citam-se fungos, algas, bactérias e plantas (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009).

A pesquisa de exopolissacarídeos foi realizada em triplicata para os meios de cultivo não concentrado e concentrado proveniente da produção em massa. Inicialmente, para o meio não concentrado, após a separação do micélio por filtração, 10 mL do meio foi transferido para um cálice de vidro ao qual foi adicionado 10 mL de etanol PA. Após homogeneização realizou-se uma filtração a vácuo em funil de Bücher (em papel com massa conhecida) e ao filtrado adicionou-se mais 10 mL de etanol PA, sendo que este procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 3 filtrações realizadas.

Para a análise utilizando o meio concentrado, 200 mL desse foi recolhido e concentrado até secar em bandeja de vidro em estufa a 40 °C. Posteriormente este foi ressuscitado com 20 mL de água destilada e a este foram adicionados 10 mL de etanol PA. Após homogeneização realizou-se uma filtração a vácuo em funil de Bücher (em papel de peso conhecido). O filtrado foi recolhido e a este adicionou-se mais 10 mL de etanol PA, o procedimento foi repetido mais uma vez, totalizando 3 filtrações realizadas.

Os papéis de filtro para os dois ensaios foram secos em estufa a 40 °C e o valor dos exopolissacarídeos foram determinados empregando-se a fórmula abaixo (COVIZZI, 2007).

$$\text{Teor de exopolissacarídeos (mg)} = \text{Massa do Papel de filtro (mg)} - \text{Massa do Papel de filtro após secagem (mg)}$$

3.2.15 TESTES BIOLÓGICOS

Todos os testes biológicos foram realizados em triplicata ou quintuplicata, com o extrato e frações obtidas por extração a quente utilizando metodologia já descrita com o emprego de Soxhlet modificado.

3.2.15.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Diplodia pinea*

A avaliação da atividade tóxica é um teste biológico muito importante e pode ser descrito simplesmente como a medida do potencial tóxico de uma substância. Comumente afirma-se que não existe substância química sem nenhuma toxicidade. Essa toxicidade irá depender da dose, tipo, tempo de exposição e pré-disposição do organismo a determinado composto. A toxicidade de uma substância pode ser classificada, em geral, segundo o tempo de resposta (aguda, sub-crônica e crônica) e segundo sua severidade (FIOCRUZ, 2016).

A aguda caracteriza-se por efeitos tóxicos produzidos após uma ou várias exposições em um curto período de tempo, apresentando rápidas manifestações. A sub-crônica é aquela observada geralmente em alguns meses após exposição sucessiva à substância nociva, sendo a crônica a exposição contínua por um longo período de tempo em geralmente 80% do tempo de vida do organismo afetado (FIOCRUZ, 2016).

Segundo a severidade podem ser leves, nas quais os distúrbios causados são rapidamente revertidos; moderadas, nas quais os distúrbios não chegam a causar danos físicos nem à saúde; severa, as quais produzem lesões graves podendo levar à morte (FIOCRUZ, 2016).

Os testes de toxicidade do extrato bruto e frações obtidas do fungo *Diplodia pinea* foram realizados empregando-se as metodologias de toxicidade frente à *Artemia salina*, teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão e em placas de ágar sangue conforme metodologia descrita, sendo que todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.15.1.1 Frente à *Artemia salina*

Inicialmente, foi preparada uma solução de água do mar artificial com 38g de sal marinho obtido comercialmente (marca Blue Greasure®) em 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9,0 com uma solução de Na_2CO_3 mantendo-o na faixa de 6 a 10,5 (LEWAN et al., 1992). Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados na água do mar artificial

durante 48 horas, em BOD com fotoperíodo 12 horas ligado, sob aeração contínua e temperatura controlada entre 27 e 30°C, para eclodir. O extrato das frações e do meio foram diluídos em metanol sendo o solvente evaporado em estufa a 40 °C por 24 horas. Como controle positivo, foi utilizado SDS, nas mesmas concentrações das amostras e como controle negativo o metanol, sendo que todos testes foram realizados em triplicata. Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para eppendorfs sendo adicionados os extratos das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, 50%etanol/50%água e o extrato acetato de etila bruto do meio, nas concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 µg.mL⁻¹. Sendo realizado o mesmo procedimento com os controles positivo e negativo. Após 24 horas foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas. Os dados foram analisados com o método estatístico IBM SPSS 22 sendo que foi possível determinar os valores de CL₅₀ com 95% de intervalo de confiança. As frações consideradas ativas foram as que apresentaram um valor de CL₅₀ inferior a 1000 ppm (MEYER et al., 1982).

3.2.15.1.2 Teste da atividade hemolítica

3.2.15.1.2.1 Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão

A atividade hemolítica das amostras foi avaliada seguindo metodologia descrita por Banerjee et al., 2008 com adaptações, sendo o ensaio realizado em triplicata. Inicialmente o sangue de carneiro (Newprov®) foi levemente homogeneizado, sendo que 5 mL foram transferidos para um tubo de Falcon de vidro, sendo este centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm. Posteriormente foi realizada a lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) até que o sobrenadante ficasse totalmente incolor, para isso foram adicionados 3mL da solução de PBS (tampão fosfato salino) e realizada a centrifugação por 50 minutos a 3000 rpm. Por fim a papa de eritrócitos obtida foi diluída com PBS para obtenção de uma suspensão com concentração de 2%.

Neste ensaio foram utilizados os extratos e frações nas concentrações de 1000 µg.mL⁻¹, 500 µg.mL⁻¹, 200 µg.mL⁻¹ e 100 µg.mL⁻¹. A

diluição das amostras foi realizada com 10% de metanol e PBS. Como controles foram utilizados 200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de PBS em 200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de solução de eritrócito a 2% (controle negativo), 200 μL de água destilada (controle positivo) e 200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de metanol (branco). Dentro de eppendorfs foram pipetados 200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ das amostras e 200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de solução de eritrócitos a 2%. Estes foram homogeneizados manualmente e levemente e incubados, destampados, em estufa por 3 horas a 37 °C. Posteriormente realizou-se a centrifugação dos mesmos a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi pipetado em placa de Elisa de 96 poços sendo por fim realizada a leitura em espectrofotômetro marca Multiskan FC Thermo Scientific® com comprimento de onda em 540 nm. A absorbância da amostra pura foi lida no mesmo comprimento de onda sendo seu valor posteriormente descontado.

Para a quantificação da hemólise, o valor foi calculado em porcentagem, considerando como valor de 100% a absorbância lida no tubo de hemólise total.

3.2.15.1.2.2 Teste de atividade hemolítica em placas de ágar sangue

Em discos de papel filtro Whatman (nº1), com aproximadamente 7mm de diâmetro, foram aplicados 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ dos extratos das frações a serem testados, na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após secagem, os discos foram colocados em placas de ágar sangue e incubados por 24 horas a 35 °C em estufa. Após este período foi realizada a leitura, sendo avaliada a existência de halo de hemólise ao redor do disco de papel. Como controles positivos para esse teste empregou-se as soluções de Saponina e Triton 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e também discos impregnados com os solventes utilizados em cada fração testada (FLACH et al., 2005).

3.2.15.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Diplodia pinea*

Na avaliação da atividade antimicrobiana a seguinte coleção de microorganismos foi utilizada: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922,

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 40175, *Candida krusei* ATCC 40147 e *Candida parapsilosis* ATCC 40038. O método de análise foi o da técnica por concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo.

Para a avaliação da atividade antibacteriana os extratos e frações foram preparados através de diluição seriada em 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de caldo Mueller-Hinton (MHB – Merck®, Darmstadt, Alemanha), em um intervalo de concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”. As suspensões bacterianas foram preparadas utilizando solução salina fisiológica padronizada na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, equivalente à escala 0.5 de McFarland. Posteriormente foram inoculadas um volume de 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ nos orifícios, obtendo-se uma concentração final de 10^4 UFC.mL⁻¹. Como controle negativo foram adicionados 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de MHB e 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ dos inóculos bacterianos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de MHB e 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de cada fração testada. Como controle positivo foi preparado com 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de MHB e 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ dos inóculos bacterianos. Por fim as microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20 horas. Após este tempo foram adicionados 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de solução aquosa de TTC a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C para posterior leitura dos resultados (SOUZA, 2013).

Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”, utilizando meio líquido RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen®, Nova York, EUA) e diluições das frações com um intervalo de concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As suspensões fúngicas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração inicial de $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, elas foram diluídas em meio líquido até obtenção de uma concentração final de $1,0$ a $5,0 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. Posteriormente foram inoculados 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ nos orifícios. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 35 °C. Após este período foram adicionados 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de TTC 0,5% e as placas foram reincubadas por três horas a 35 °C para posterior leitura dos resultados. Como controle negativo

foram adicionados 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de MHB e 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ dos inóculos fúngicos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de MHB e 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de cada fração testada. Como controle positivo foi preparado com 100 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de MHB e 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ dos inóculos fúngicos (SOUZA, 2013).

3.2.15.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Diplodia pinea*

A oxidação é definida como a perda de um ou mais elétrons para outra substância. A transferência de elétrons é um processo químico fundamental para a sobrevivência celular. O efeito colateral da oxidação é a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio que podem levar ao dano oxidativo (ALVES et al., 2010).

Os radicais livres (RL) são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos atuando como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções importantes em nosso metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro. Os RL possuem diferentes papéis no organismo estando envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Apesar da sua importância, o seu excesso apresenta efeitos deletérios como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares. Sendo assim estes estão intimamente ligados a inúmeras patologias, por exemplo, como o câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, disfunções cognitivas (ALVES et al., 2010).

Para combater os RL os organismos vivos produzem substâncias capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo assim um papel antioxidante. Além destas substâncias podem-se obter externamente componentes com potencial antioxidante que podem ser introduzidas no

ciclo de vida seja pela alimentação ou medicamentos, sendo este um campo importante para a indústria alimentícia e farmacêutica (ALVES et al., 2010).

A avaliação da atividade antioxidante para o fungo *Diplodia pinea* foi realizada empregando como amostra seus extratos em triplicata e utilizando o método de redução do radical DPPH, quantificação do conteúdo total de compostos fenólicos (Método do Folin Ciocalteau) e redução do complexo do fosfomolibdênio.

3.2.15.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

O ensaio foi realizado com amostras em triplicata e teve como objetivo, avaliar a capacidade dos extratos e frações de reduzirem o radical livre 2,2 - difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), o resultado da reação é uma mudança de cor que pode ser medida por diferença de absorbância por espectrofotometria.

Inicialmente foi realizado um *screening* com todos os extratos nas concentrações de 100, 300 e 500 μL , respectivamente.

A partir dessa avaliação foram estabelecidas curvas nas concentrações em que se observou atividade para cada extrato. Foram adotadas as concentrações de 200, 300, 400, 500 e 600 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o acetato de etila da massa fúngica; 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o acetato de etila do meio e 100, 150, 200, 250 e 300 μL para o etanol 50%/água 50%.

Na avaliação dos resultados foram calculados os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC_{50}), estes estão representados graficamente, sendo que a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico ($y = ax + b$) foi utilizada como base para a determinação da IC_{50} .

As amostras foram diluídas em metanol absoluto e nos tubos de ensaio foram pipetados a amostra e 1 mL^{-1} de solução de DPPH a 0,03 mmol.mL^{-1} preparada no momento da análise em metanol. Como padrões foram utilizadas a rutina (2,0 a 12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), a vitamina C (1,6 a 8 $\mu\text{g/mL}$) e

como branco o metanol e a amostra pura, sendo a absorbância da coloração posteriormente descontada. As amostras foram incubadas no escuro a temperatura ambiente e lidas após 30 minutos, onde a absorbância foi medida em 518 nm, e a atividade antioxidante calculada de acordo com a fórmula abaixo. A reação de positividade é indicada pela mudança de cor de púrpura para amarela, o que leva a diminuição da absorção quando realizada a leitura em espectrofotômetro. A análise estatística para verificação da variância (ANOVA) foi aplicada com teste de Duncan (MENSOR et al., 2001).

$$\% \text{ inibição do DPPH} = \frac{100 - (\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100}{\text{Abs. Controle}}$$

3.2.15.3.2 Avaliação de Polifenóis Totais pelo método de Folin Ciocalteau

Este método baseia-se no fato de que, devido à presença dos ânions heteopoli-fosfotungstato-molibdatos que, em meio básico são capazes de reagir com compostos fenólicos formando o ânion fenolato. Este ânion tem a capacidade de reduzir o reagente de molibdato em óxido de molibdênio formando um complexo de cor azul intensa chamado complexo molibdênio-tungstênio (ROGINSKY e LISSI, 2005). Considera-se altas as concentrações de fenóis acima de 50 mg.EAG.g⁻¹ e média-alta de 50-30 mg.EAG.g⁻¹.

A metodologia adotada para este teste foi a de Singleton (1999) com modificações. As amostras foram diluídas em metanol na concentração de 1mg.mL⁻¹. Inicialmente as amostras, a água e o Folin-Ciocalteau foram misturados e agitados. Após 10 minutos em repouso, adicionou-se carbonato de cálcio (Na₂CO₃) a 10% por 30 minutos em repouso. Transcorrido este tempo foi realizada a leitura em 760 nm. Foi realizada durante a análise uma curva com ácido gálico como controle nas concentrações 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 µg.mL⁻¹.

Os teores de fenóis totais obtidos foram determinados em miligramas de ácido gálico por grama de amostra. Para a curva de

calibração foi utilizada a equação abaixo onde y é a absorbância e x a concentração final de equivalentes de ácido gálico pela concentração utilizada de extrato. Foi medida a coloração da amostra pura, sendo esta posteriormente descontada.

$$Y = 0,0392 x - 0,0583; R^2 = 0,9964$$

3.2.15.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Fosfomolibdênio

Este ensaio foi realizado para avaliar a atividade de compostos lipofílicos e hidrofílicos e baseia-se na redução do molibdênio VI em molibdênio V na presença de substâncias com atividade antioxidante, levando a formação de um complexo verde fosfato/molibdênio. Como padrões empregou-se a Vitamina C e a Rutina por apresentarem conhecidas capacidades antioxidantes já descritas na literatura considerando sua efetividade antioxidante de 100% e 66%, respectivamente (PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999).

Em um tubo de ensaio 0,3 mL⁻¹ das amostras (extratos e frações na concentração de 200 µg.mL⁻¹ em metanol) foram pipetadas, sendo adicionadas a estas 1 mL de reativo (solução de fosfato de sódio 0,1M - 28 mL, molibdato de amônio 0,03M - 12 mL⁻¹ e ácido sulfúrico 3M - 20 mL⁻¹, água destilada qsp 100 mL⁻¹). Os tubos foram levados ao banho termostatizado, 95 °C, por 90 minutos, sendo posteriormente, resfriados a temperatura ambiente. As amostras foram pipetadas em placa de Elisa de 96 poços e em espectrofotômetro realizou-se a leitura da absorbância em comprimento de onda de 695 nm (BIANCO, 2003). Como padrões foram empregados a vitamina C e a rutina. A absorbância da amostra pura foi medida sendo que o valor da sua coloração descontado. A atividade antioxidante foi avaliada com base nas fórmulas abaixo:

$$\text{AA\% em relação à rutina} = \frac{\text{Abs. (amostra)} - \text{Abs. (branco)}}{\text{Abs. (rutina)} - \text{Abs. (Branco)}} \times 100$$

$$\text{AA\% em relação à vitamina C} = \frac{\text{Abs. (amostra)} - \text{Abs. (branco)}}{\text{Abs. (vitamina C)} - \text{Abs. (Branco)}} \times 100$$

Para a verificação da diferença estatística foi aplicada a análise de variância – ANOVA e para localização das diferenças o teste de Duncan.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

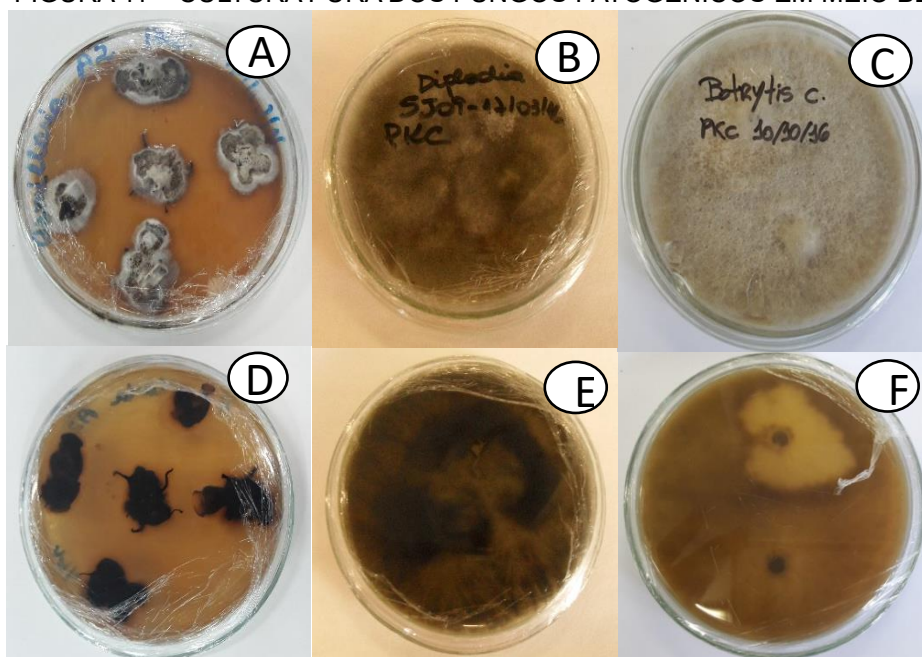
4.1 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*

O fungo *Armillaria* sp. em meio de cultura apresentou micélio crustoso, de coloração marrom escura e rizomorfos em forma de cordão, com ramificação dicotômica. Em placa além dessas características observou-se que as colônias apresentam superficialmente um aspecto levemente aveludado (AUER e SANTOS, 2009). Estas características podem ser observadas na Figura 11 A, 11 D, 12 A e 12 B.

O fungo *Botrytis cinerea* em meio de cultura e placa apresentou coloração cinzenta e crescimento radial. Possui uma consistência aveludada sendo possível dependendo da sua fase de desenvolvimento observou-se esporos na microscopia (ALFENAS et al., 1999). Essas características podem ser visualizadas na cultura em placa e em meio líquido, conforme demonstrado nas figuras 11 C, 11 F, 12 E e 12 F.

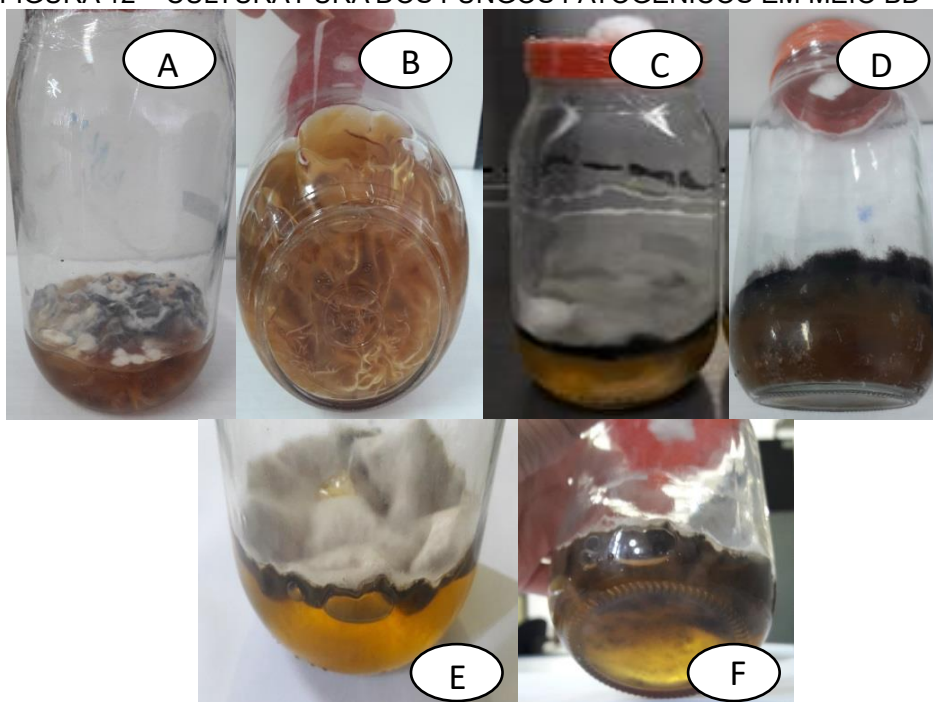
O fungo *Diplodia pinea* apresentou em placa e meio de cultura, crescimento radial, aspecto aveludado, iniciando seu crescimento com coloração branca sendo que as colônias posteriormente apresentaram escuras, como observado nas figuras 11 B, 11 E, 12 C e 12 D. Em microscopia dependendo da sua fase do ciclo de vida e foi possível observar conídios de forma oblonga para clavado de coloração marrom e esporos (CORRÊA, AUER e SANTOS, 2013).

FIGURA 11 – CULTURA PURA DOS FUNGOS PATOGENICOS EM MEIO BDA



NOTA: (1) **A:** CULTURA DE *Armillaria* sp. **B:** CULTURA DE *Diplodia pinea*. **C:** CULTURA DE *Botrytis cinerea*. **D:** CULTURA DE *Armillaria* sp. (PARTE INFERIOR DA PLACA). **E:** CULTURA DE *Diplodia pinea*. (PARTE INFERIOR DA PLACA). **F:** CULTURA DE *Botrytis cinerea*. (PARTE INFERIOR DA PLACA).
 FONTE: O autor (2017)

FIGURA 12 – CULTURA PURA DOS FUNGOS PATOGENICOS EM MEIO BD



NOTA: (1) **A e B:** CULTURA DE *Armillaria* sp. **C e D:** CULTURA DE *Diplodia pinea*. **E e F:** CULTURA DE *Botrytis cinerea*.
 FONTE: O autor (2017)

4.2 CULTIVO E SELEÇÃO DO MEIO LÍQUIDO PARA OS FUNGOS

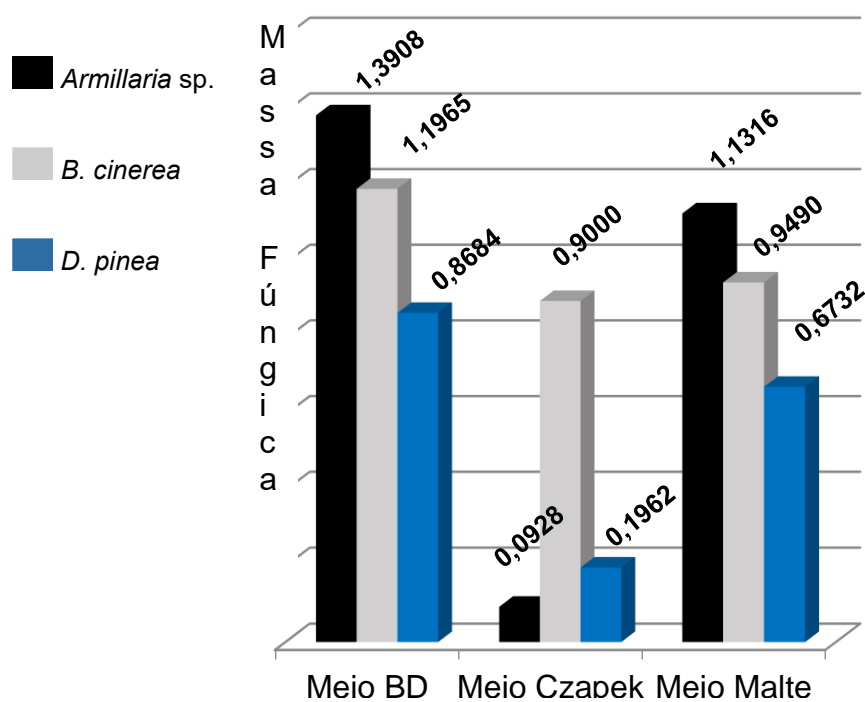
Armillaria sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*

Analisando a produção em meio líquido obteve-se os resultados para cada um dos fungos, sendo que o meio BD demonstrou melhor produção de massa fúngica sobre os outros meios testados. Somente o fungo *Botrytis cinerea* não apresentou diferença estatística entre os meios BD e Czapek, isso pode estar ligado ao fato desse fungo parasitar frutas como uva e morango o que indica que ele utilize bem a glicose como fonte de carboidratos (constituente do meio Czapek).

Os dados encontrados corroboram com artigos já publicados que afirmam um amplo uso na produção de fungos em meio BD como o estudo de Clementino e Rosado (2008), Ferdinandi e Rosado (2008) e Berger (2013). Este meio proporciona um bom crescimento para muitos fungos, possui uma fonte de carboidrato fácil de ser metabolizada e utilizada pelo microorganismo. É um meio barato e de baixa complexidade, essas características tornam o meio BD amplamente utilizado atualmente.

Os resultados podem ser claramente visualizados no gráfico 1 e tabela 1:

GRÁFICO 1 - TESTE DOS MEIOS PARA OS FUNGOS PATOGENICOS



FONTE: O autor (2017)

TABELA 1 – ESTATÍSTICA DOS TESTES DOS MEIOS

<i>Armillaria sp.</i>				
Meio	Rendimento da massa fúngica nos meios (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan		
BD	1,3908	a		
Czapek	0,0928			c
Malte	1,1316		b	
<i>Botrytis cinerea</i>				
Meio	Rendimento da massa fúngica nos meios (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan		
BD	1,1965			b
Czapek	0,900			b
Malte	0,949	a		
<i>Diplodia pinea</i>				
Meio	Rendimento da massa fúngica nos meios (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan		
BD	0,8684	a		
Czapek	0,1962			c
Malte	0,6732		b	

NOTA: amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

FONTE: O autor (2017)

4.3 CURVA DE TEMPERATURA DE *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*

Para maior obtenção de massa fúngica em gramas, para os isolados A2 de *Armillaria* sp. e DP6/SJO de *Diplodia pinea*, a temperatura mais promissora foi a de 20°C. No caso do fungo *Botrytis cinerea*, observou-se a ausência de crescimento na temperatura de 32°C, podendo-se concluir que para este isolado a melhor temperatura de crescimento em função da massa fúngica foi de 12°C.

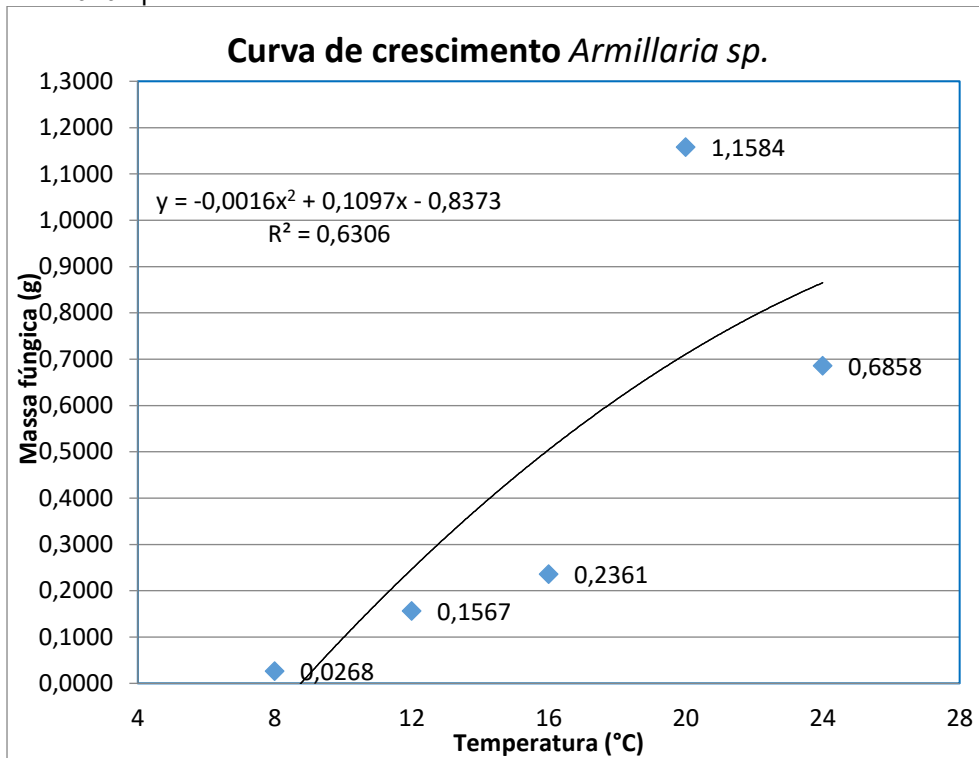
Os resultados obtidos para cada um dos microrganismos testados, a reta polinomial, a interseção e o valor de R quadrado são apresentados nos gráficos 2, 3 e 4. A análise estatística apontou que não houve diferença estatística de crescimento de biomassa fúngica nas temperaturas de 8 °C, 12 °C e 16 °C para o fungo *Armillaria* sp., 24 °C e 28 °C para o fungo *Botrytis cinerea* e em 20 °C, 24 °C e 28 °C para o fungo *Diplodia pinea*, indicando que nessas temperaturas o crescimento micelial é basicamente o mesmo não variando significativamente em gramas.

Esses dados corroboram com a literatura que indica que os fungos fitopatogênicos tem uma ampla faixa de crescimento (- 5 °C a 45 °C), sendo adaptáveis a diversas temperaturas, o que indica uma resistência a ambientes hostis (MICHEREFF, 2013). Fica evidente que apesar do crescimento micelial ser maior na temperatura ótima de crescimento o fungo é capaz de produzir biomassa em outras temperaturas.

Os fungos *Armillaria* sp. e *Diplodia pinea* crescem bem a temperatura ambiente como já demonstrado em estudos anteriores como o de Silva (2014), já o *Botrytis cinerea* mostrou-se menos resistentes a temperaturas elevadas, fato que se deve a esse fungo apresentar melhor crescimento em ambientes frios, como já citado em estudo de COSTA (2014).

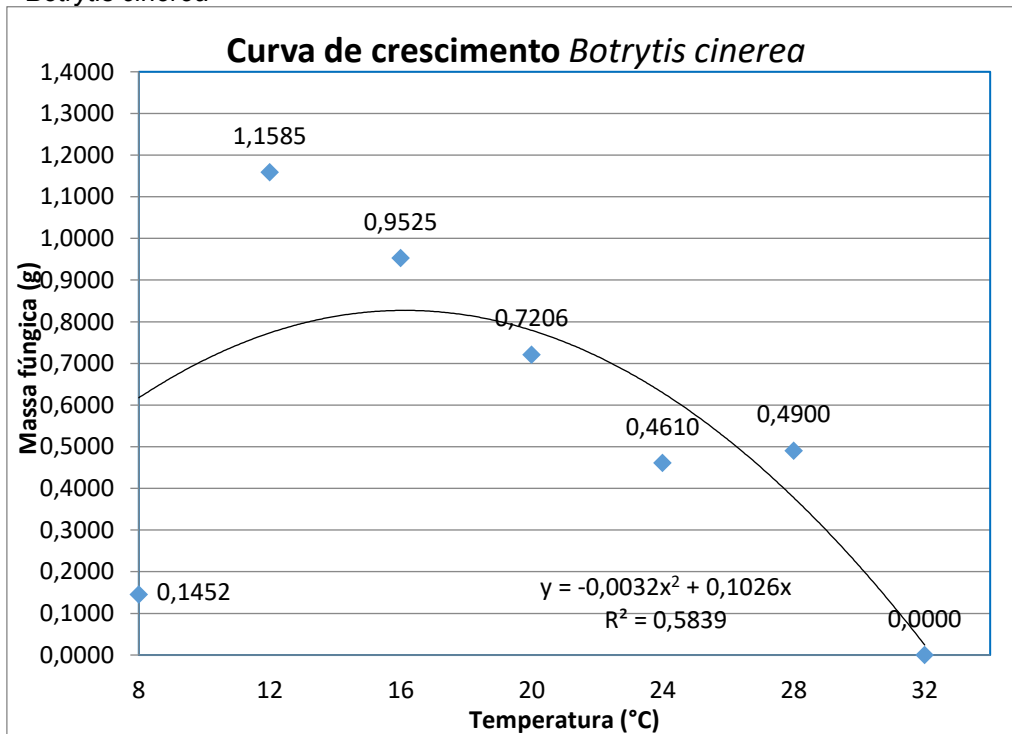
Os resultados podem ser visualizados na tabela 2 respectivamente.

GRÁFICO 2 – CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA DE *Armillaria* sp.



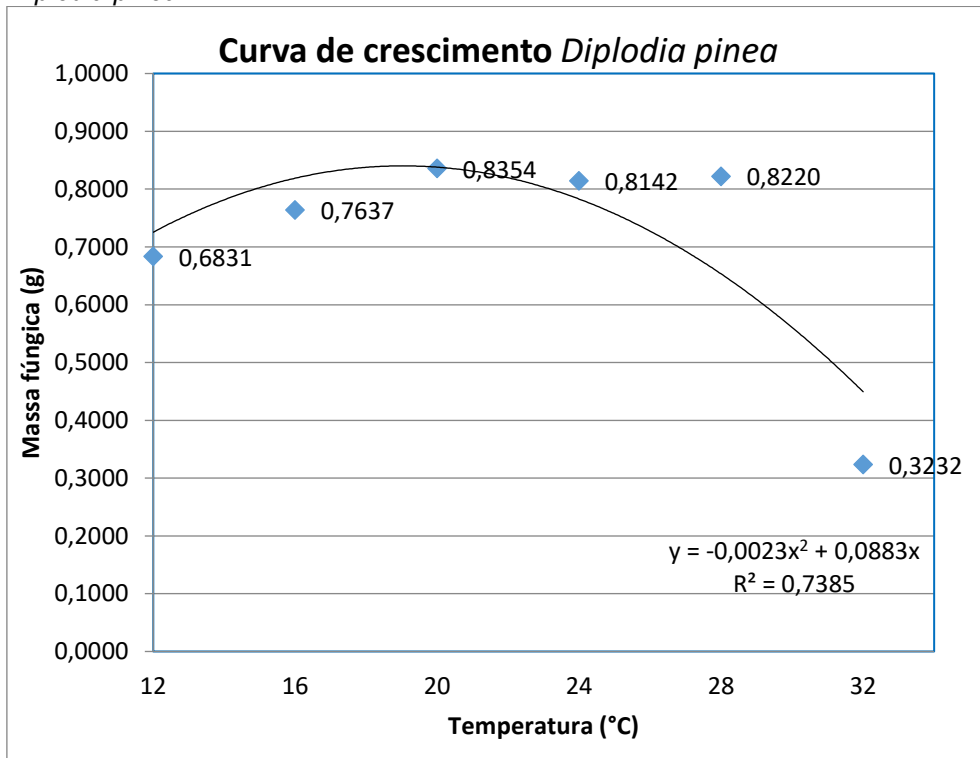
FONTE: O autor (2017)

GRÁFICO 3 – CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA DE *Botrytis cinerea*



FONTE: O autor (2017)

GRÁFICO 4 – CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA DE *Diplodia pinea*



FONTE: O autor (2017)

TABELA 2 – DADOS ESTATÍSTICOS PARA A PRODUÇÃO MICELIAL EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA

<i>Armillaria sp.</i>						
Temperatura	Crescimento (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan				
8°	0,0268		b			
12°	0,1567		b			
16°	0,2361		b			
20°	0,9556	a				
24°	0,6858					c
<i>Botrytis cinerea</i>						
Temperatura	Crescimento (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan				
8°	0,1452					e
12°	1,1585	a				
16°	0,9525		b			
20°	0,7206			c		
24°	0,4610				d	
28°	0,4990				d	
32°	Não houve crescimento	-	-	-	-	-
<i>Diplodia pinea</i>						
Temperatura	Crescimento (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan				
12°	0,6831			c		
16°	0,7637		b			
20°	0,8354	a				
24°	0,8142	a				
28°	0,8220	a				
32°	0,3232				d	

NOTA: AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE

FONTE: O autor (2017)

Foi realizado o perfil por CCD para observação de possíveis substâncias ao longo do tempo (tabela 5) foi importante para avaliar diferentes substâncias foram produzidas em temperaturas diferentes, levando em consideração que fatores estressantes ao microorganismo, como a temperatura, podem alterar a fisiologia do mesmo. Com base no padrão encontrado na cromatografia a positividade de substâncias observadas não se alterou de devido à temperatura, observa-se, porém na CLAE-UV que a concentração desses compostos produzidos pelo

microorganismo é maior em temperaturas desfavoráveis para o mesmo, o que reforça a hipótese de que o fungo sobre condições de estresse produz mais substâncias de interesse, seja para proteção ou sobrevivência.

Obteve-se positividade compatível com as outras CCDs realizadas confirmando o indicativo de presença de esteroides, flavonoides e polifenóis. Os resultados estão dispostos na tabela 3.

TABELA 3 – RESULTADOS DE CCD PARA A TEMPERATURA – *Diplodia pinea*

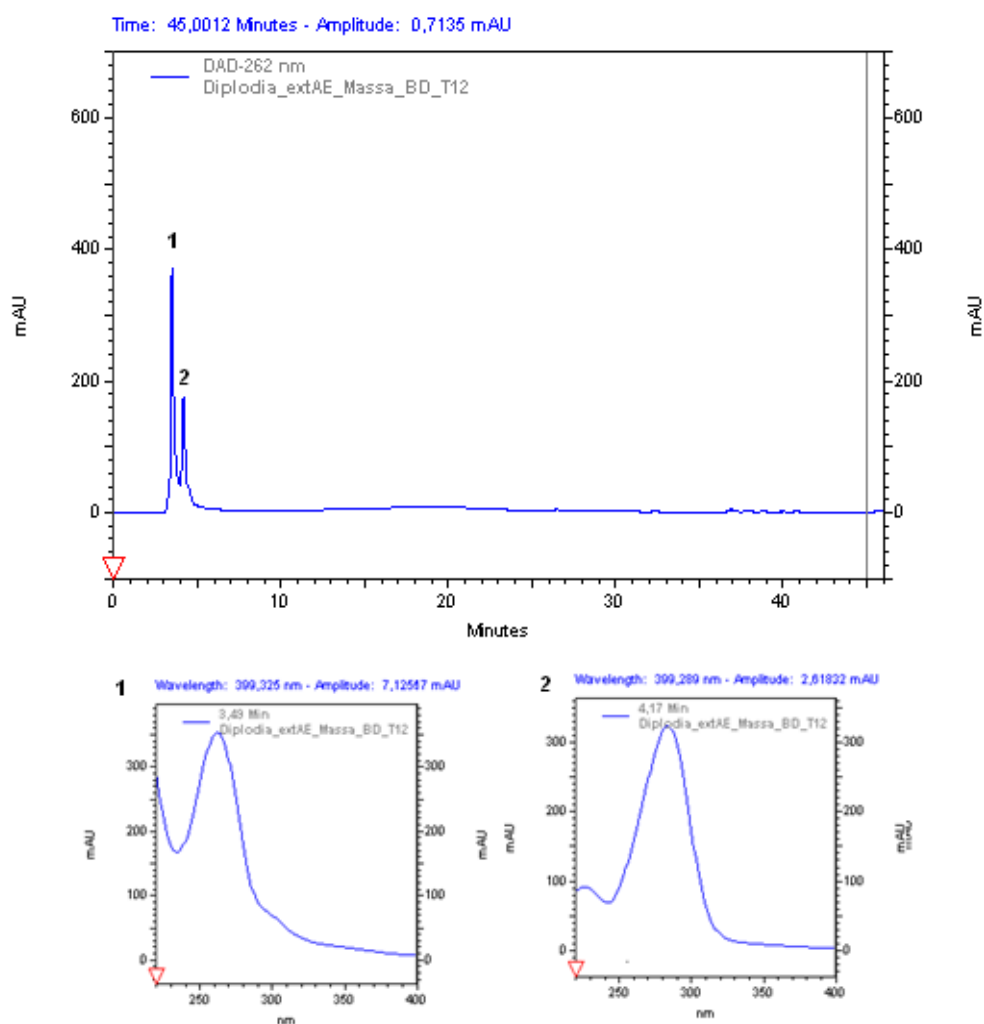
Constituinte químico	12 °C	16 °C	20 °C	24 °C	28 °C	32 °C
Esteroides e triterpenos	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+
Taninos e Polifenóis	+	-	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-

NOTA: (1) + INDICA REAÇÃO POSITIVA; - INDICA REAÇÃO NEGATIVA.

FONTE: O autor, 2017

Na cromatografia líquida de alta eficiência, realizada com o extrato obtido a partir da massa micelial, observou-se a presença de dois picos primordiais que apareceram mais evidentes nas temperaturas de 12 °C, 16 °C e 32 °C graus (pico 1 e 2) ilustrados na figura 13, 14 e 18, e a ausência quase total dessas substâncias na temperatura de 28 °C (figura 17). As concentrações destas substâncias variaram em diferentes temperaturas, o que pode ser observado pela intensidade dos picos em todos os cromatogramas. Observou-se que a substância representada pelo pico 1 apresentou maior concentração na temperatura de 16 °C, enquanto que a substância representada pelo pico 2 teve sua maior concentração em 12 °C. Isso ocorre, pois dependendo da temperatura o fungo produz o metabólito em maior ou menor quantidade.

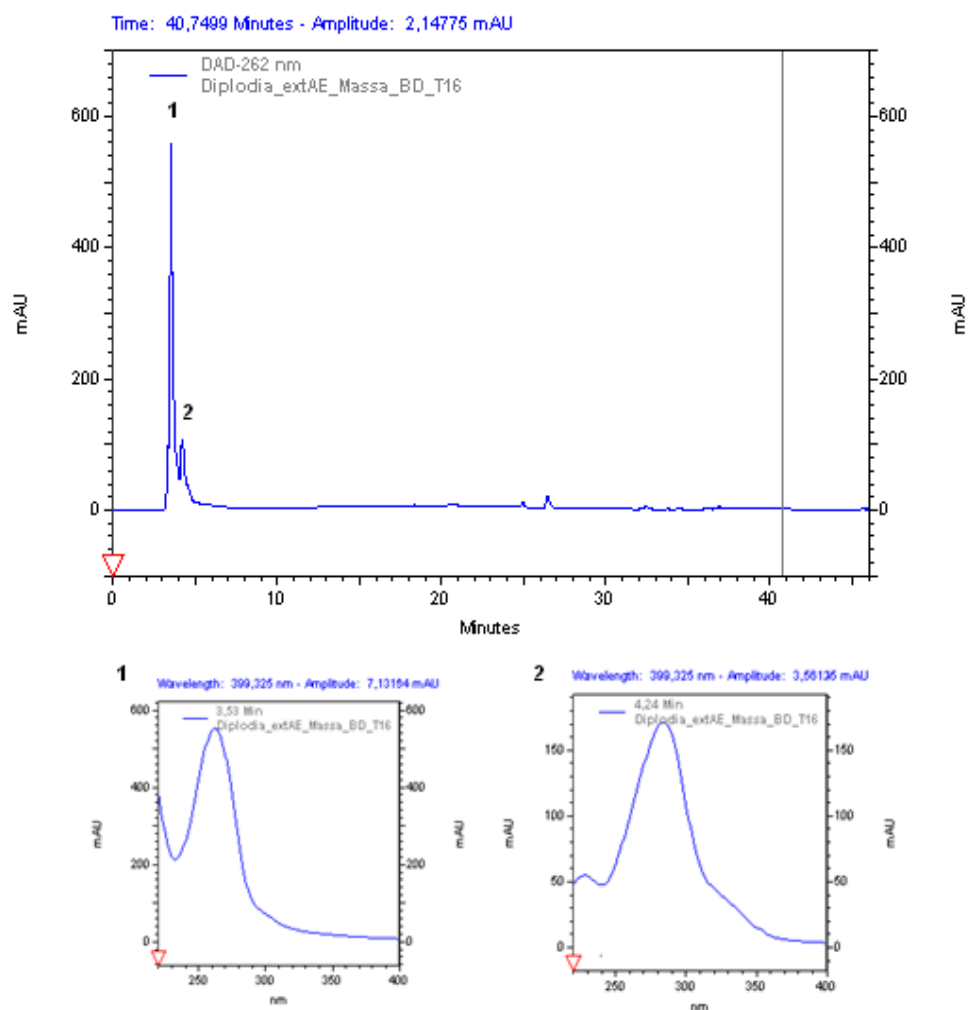
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 12 °C - FUNGO *Diplodia pinea*



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,49	263
2	4,16	284

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
 FONTE: O autor (2017)

FIGURA 14 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 16 °C - FUNGO *Diplodia pinea*

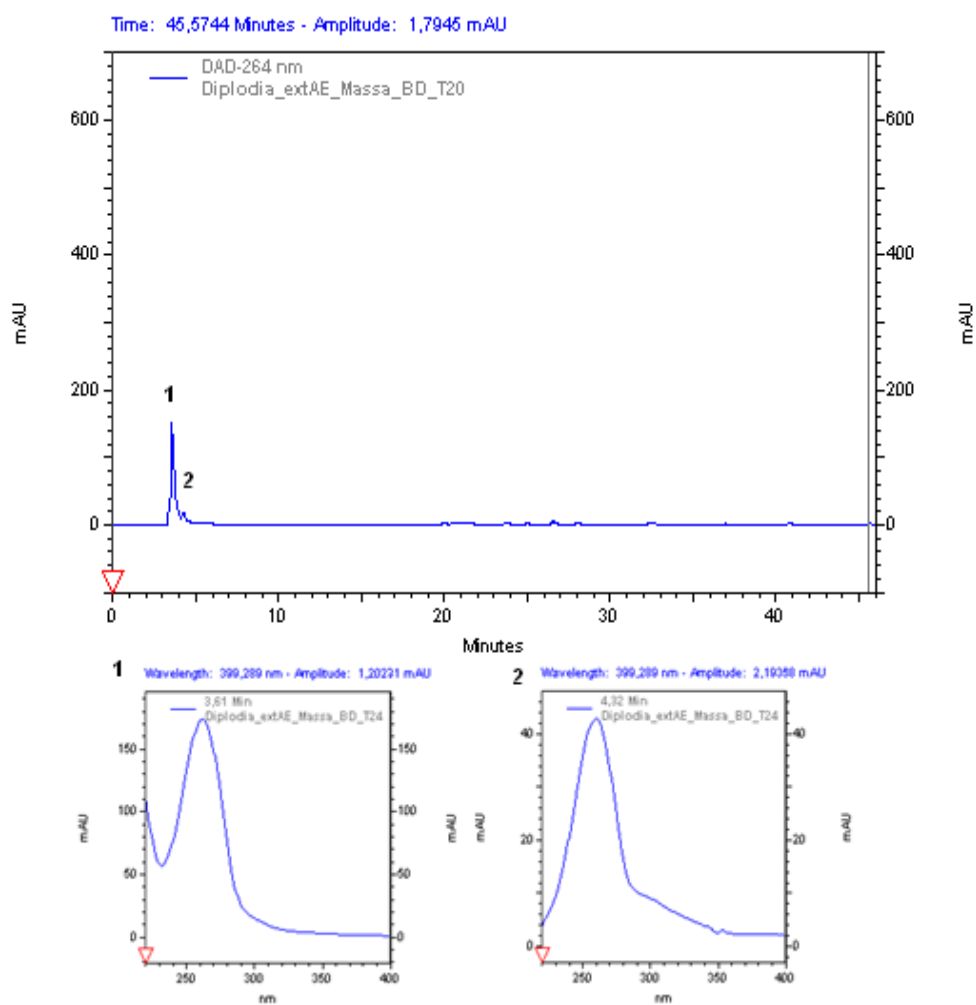


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,56	263
2	4,23	284

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

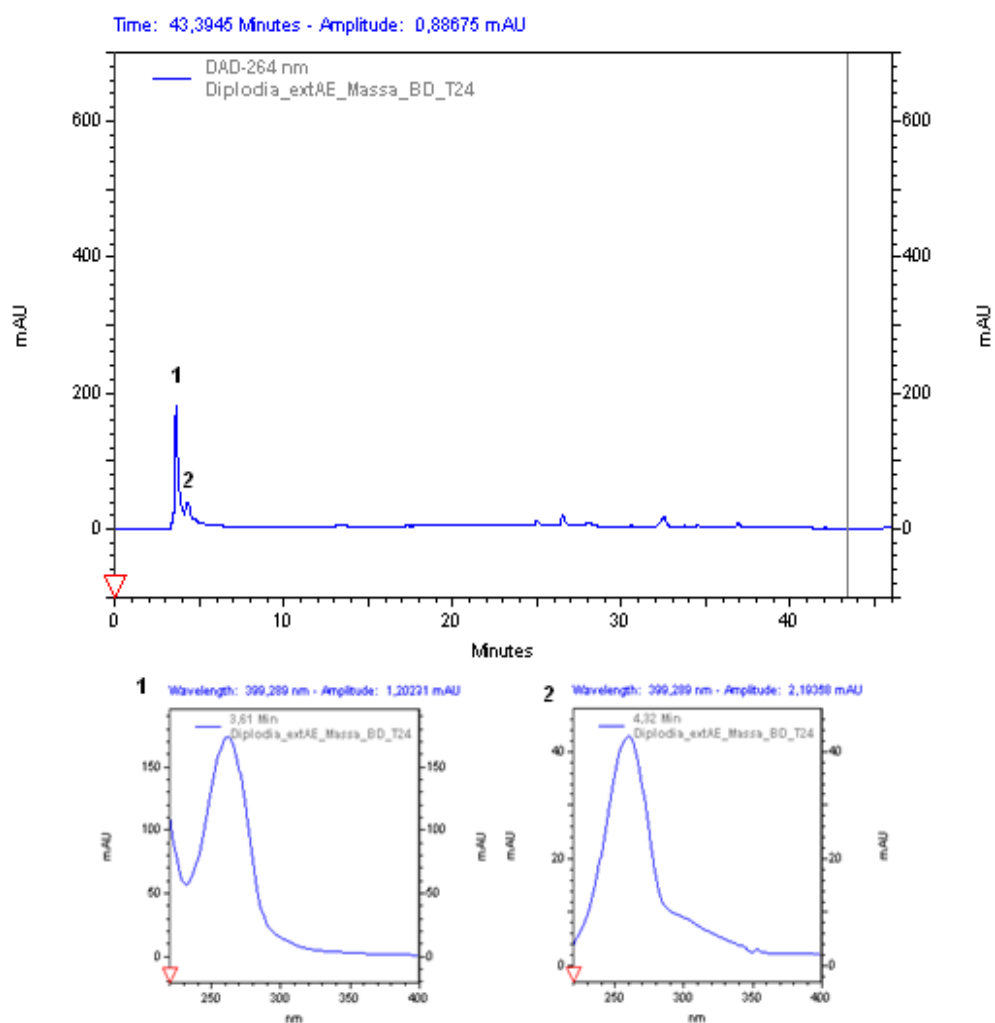
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 20 °C - FUNGO *Diplodia pinea*



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,58	262
2	4,27	261

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
 FONTE: O autor (2017)

FIGURA 16 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 24 °C - FUNGO *Diplodia pinea*

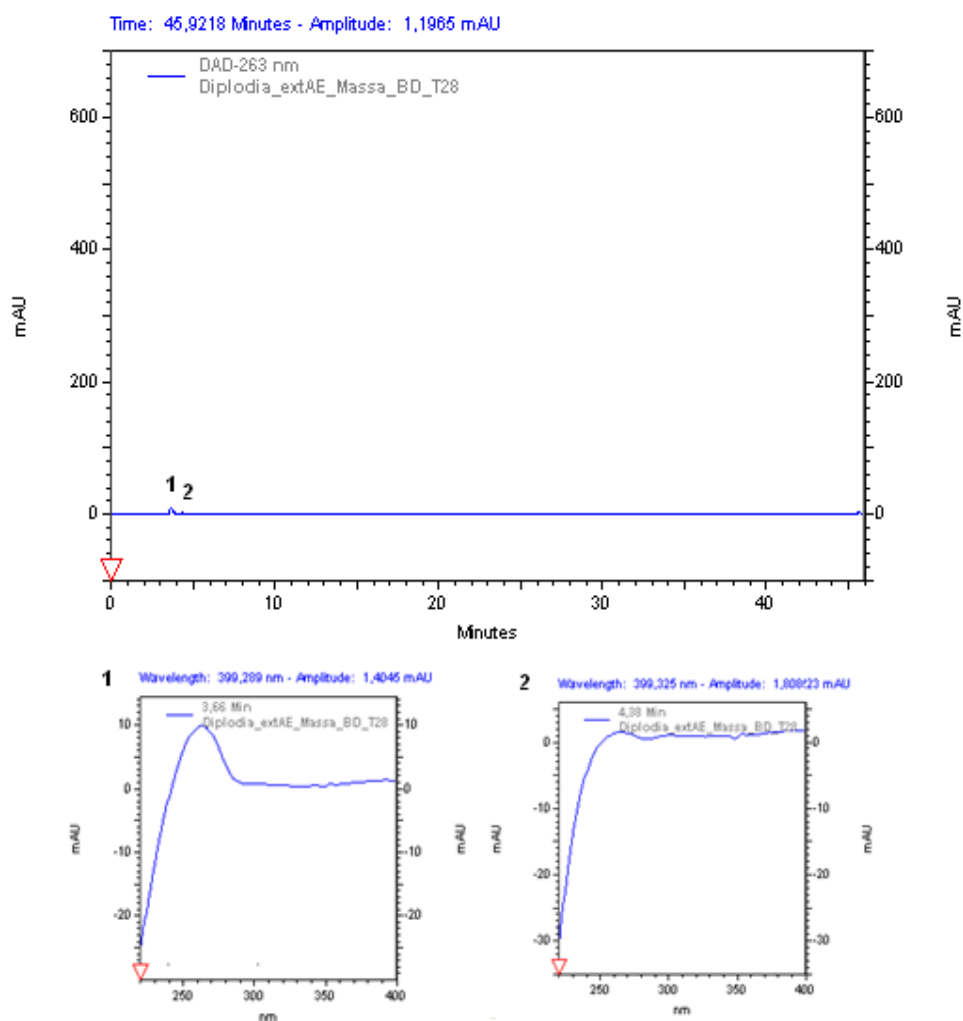


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,62	262
2	4,31	260

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

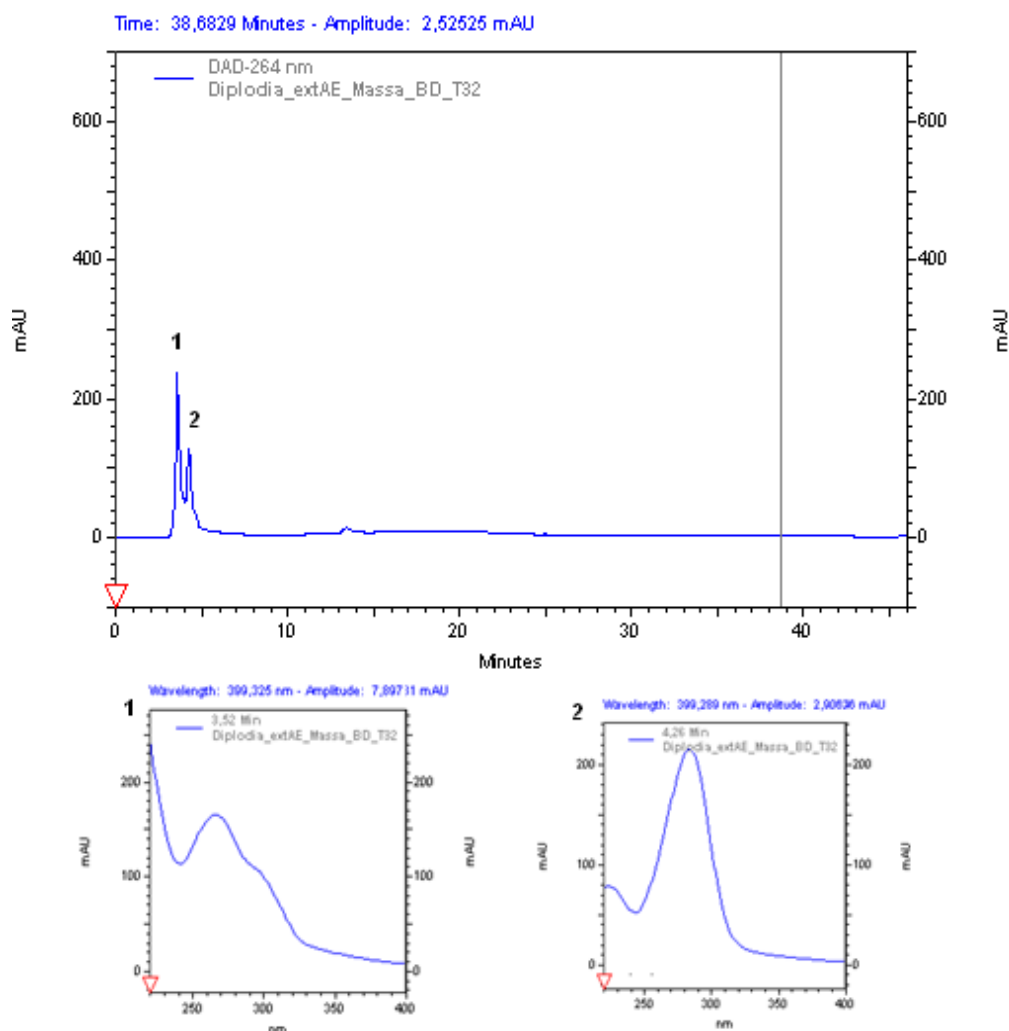
FIGURA 17 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 28 °C - FUNGO *Diplodia pinea*



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,64	263
2	4,36	267

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
 FONTE: O autor (2017)

FIGURA 18 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO BD A 32 °C - FUNGO *Diplodia pinea*



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,59	265
2	4,25	285

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
 FONTE: O autor (2017)

As temperaturas de 12 °C e 16 °C são as temperaturas de maior produção de micélio, sendo consideradas temperaturas em que o fungo está sobre estresse podem justificar a produção intensa de determinado metabólito secundário devido às condições não ideais de cultivo. Os metabólitos apresentaram melhor separação na temperatura de 32 °C. Conclui-se desta maneira que dependendo da temperatura de cultivo as

quantidades de metabólitos secundários mudam sendo possível a otimizar uma maior produção de metabólito pela temperatura de crescimento.

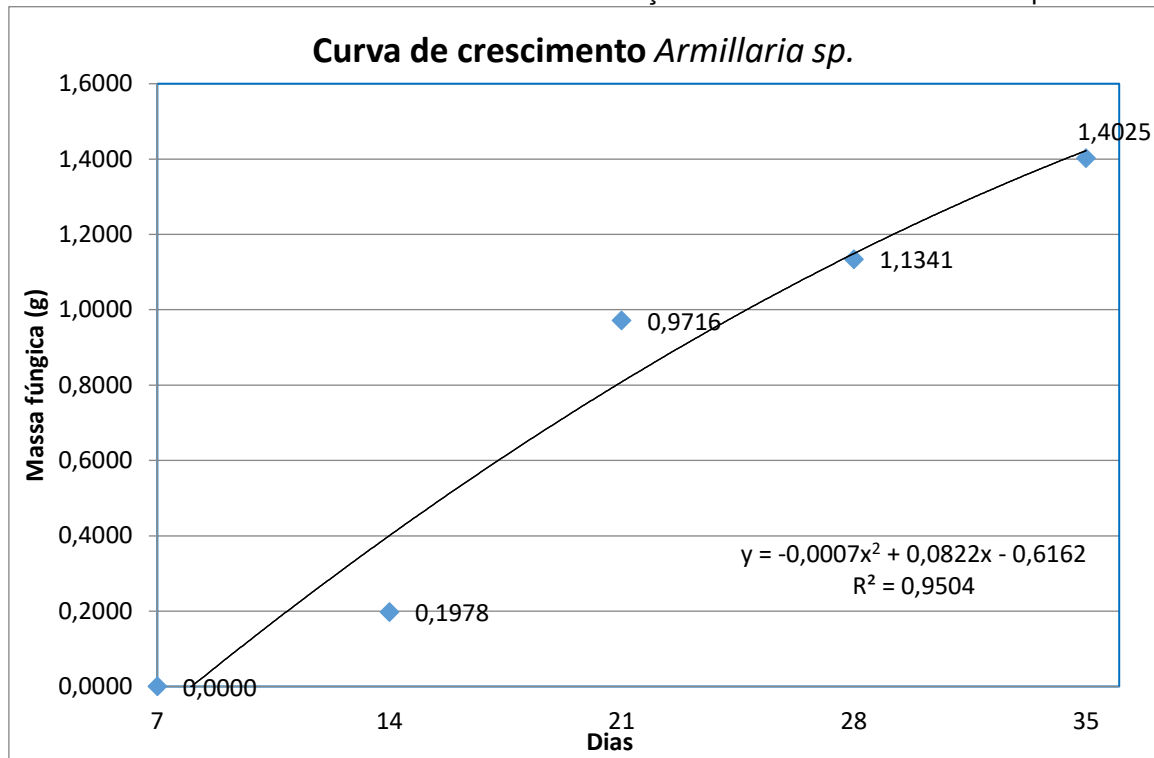
Observando-se o seu tempo de retenção as substâncias apresentam características polares, pois pela fase móvel empregada e sua interação com a coluna elas saem antes das substâncias apolares. Como metabólitos secundários importantes e polares pode-se citar como exemplo os flavonoides que apresentam atividades de interesse farmacológico, como por exemplo, sua reconhecida ação antioxidante (BEHLING et al., 2004).

4.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA SECA AO LONGO DO TEMPO DE *Armillaria* sp., *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*

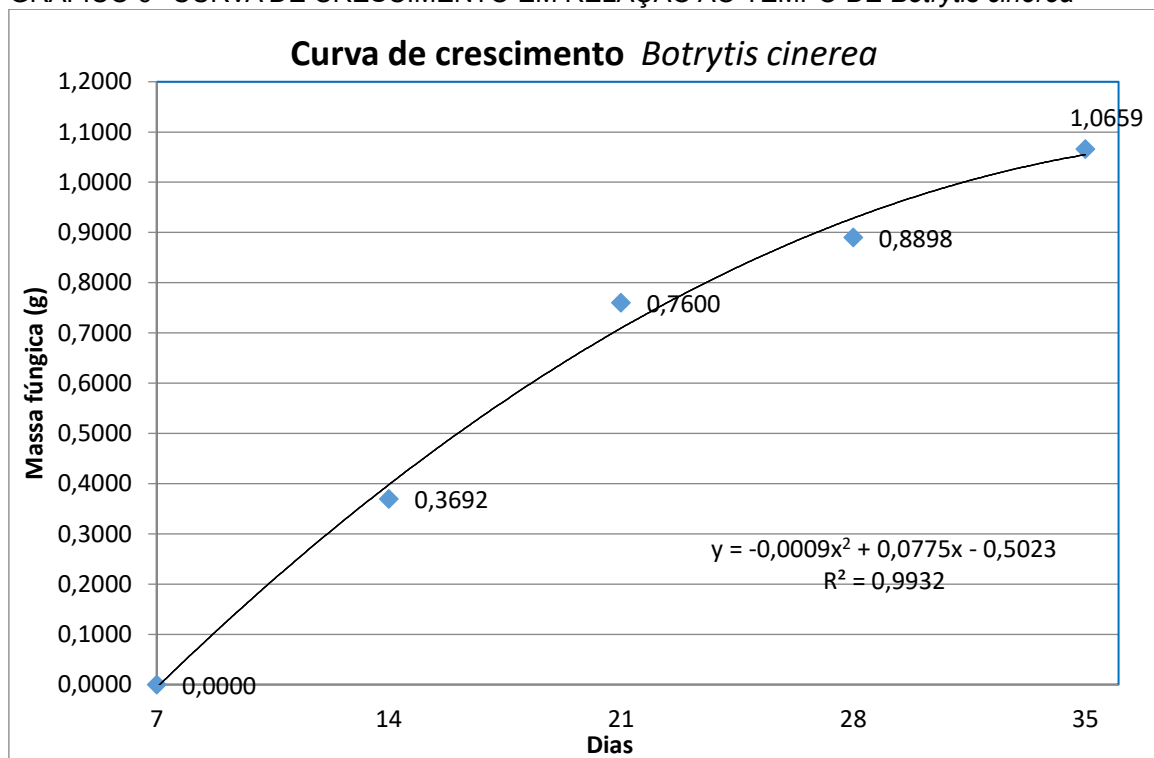
Com base nos resultados obtidos neste experimento, foi possível observar a maior produção de biomassa fúngica em virtude do tempo de cultivo. Com base nos gráficos, equação expressa nos mesmos e cálculos realizados, o melhor tempo de crescimento encontrado foi superior a 35 dias para todos os fungos testados podendo-se indicar que o melhor crescimento é em média de 59 dias para o fungo *Armillaria* sp., 43 dias para o *Botrytis cinerea* e de 35 dias para o fungo *Diplodia pinea*. Após esse período observa-se um decaimento na produção de biomassa fúngica, o que indica a entrada do fungo no período de decaimento, posterior a fase estacionária, e consequente morte do mesmo.

A análise estatística demonstrou diferença de crescimento em todos os períodos de tempo em que as alíquotas foram retiradas, isso se dá devido as diferentes fases da cinética de crescimento dos microorganismos, essa cinética pode ser dividida em lag fase, crescimento exponencial, crescimento linear, desaceleração, fase estacionária e fase de declínio. Essa cinética já foi estudada com outros fungos em trabalhos anteriores como o de Gomes (2015) onde se constatou o mesmo padrão.

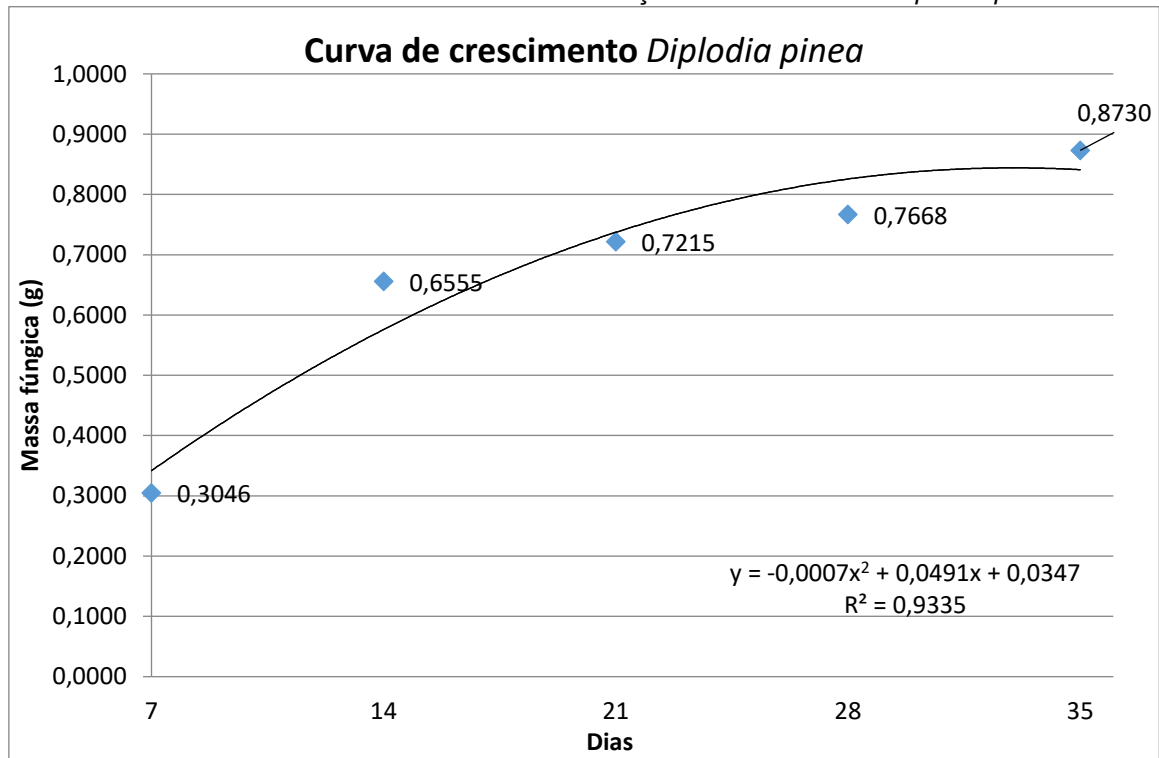
Os dados podem ser observados na tabela 4, sendo a cinética de crescimento em função do tempo evidenciada nos gráficos 5, 6 e 7.

GRÁFICO 5 - CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE *Armillaria* sp.

FONTE: O autor, 2017

GRÁFICO 6- CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE *Botrytis cinerea*

FONTE: O autor (2017)

GRÁFICO 7- CURVA DE CRESCIMENTO EM RELAÇÃO AO TEMPO DE *Diplodia pinea*

FONTE: O autor (2017)

TABELA 4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA EM FUNÇÃO DO TEMPO

<i>Armillaria</i> sp.						
Dias	Crescimento (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan				
7	Não houve crescimento				d	
14	0,1978			c		
21	0,9716		b			
28	1,1341		b			
35	1,4025	a				
<i>Botrytis cinerea</i>						
Dias	Crescimento (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan				
7	0					e
14	0,3692				d	
21	0,7600			c		
28	0,8898		b			
35	1,0659	a				
<i>Diplodia pinea</i>						
Dias	Crescimento (g/L ⁻¹)	Classificação do teste de Duncan				
7	0,3046					e
14	0,6555				d	
21	0,7215			c		
28	0,7668		b			
35	0,8730	a				

NOTA: AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE
 FONTE: O autor (2017)

4.5 PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA DE *Diplodia pinea*

Com a análise dos dados encontrados nos experimentos das curvas meio de cultivo, temperatura e tempo, Aperfeiçoou-se o cultivo do fungo *in vitro*. Levou-se em consideração seu maior rendimento em gramas de biomassa em um menor tempo de cultivo, sem negligenciar a produção de metabólitos secundários.

Analisando os resultados obtidos, obteve-se um maior rendimento

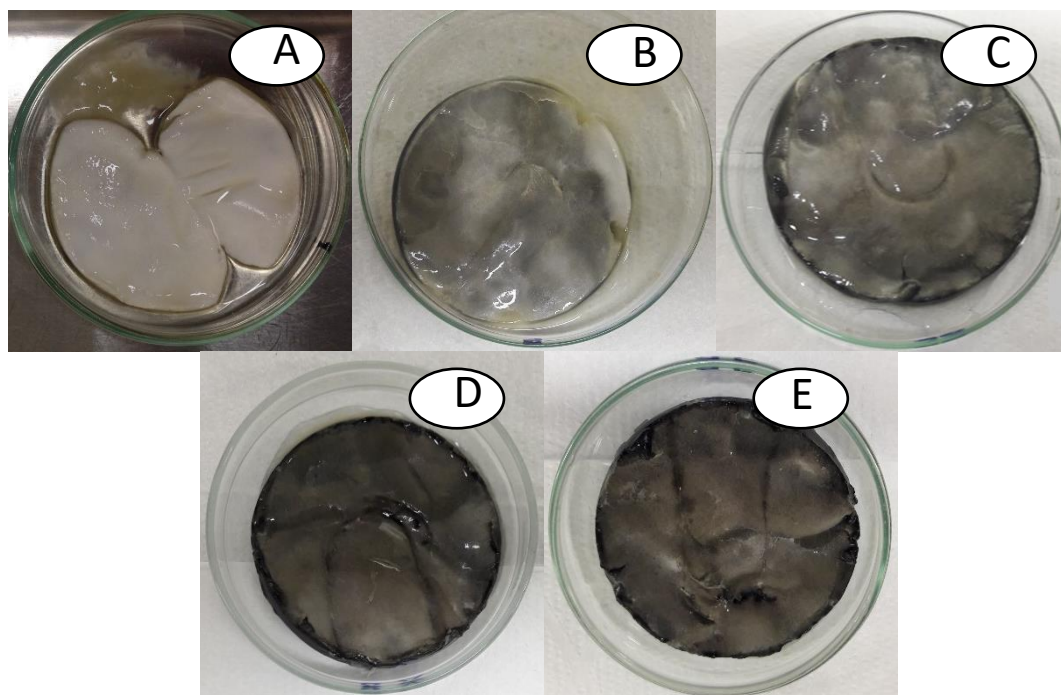
de micélio com 35 dias de cultivo do fungo. Observa-se, porém que essa produtividade não apresenta tanta superioridade em relação ao observado em 21 dias. Sendo assim, conclui-se que com menos 14 dias de cultivo, obteve-se uma produção em gramas de valor considerável, sendo possível obter mais massa fúngica inoculando o fungo de 21 em 21 dias do que mantendo seu cultivo até 35 dias, para uma posterior reinoculação.

Foi estabelecida uma produção em massa a 20 °C, por 21 dias, em repouso e com fotoperíodo desligado. Toda biomassa obtida foi liofilizada e utilizada na produção dos extratos.

4.6 PRODUÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO DE *Diplodia pinea*

Utilizando as metodologias de CCD e CLAE-UV, foi possível realizar um perfil da presença de compostos secundários produzidos pelo fungo a cada 7 dias. O crescimento micelial e as características da cultura a cada período de tempo medido pode ser visualizado na figura 19.

FIGURA 19 – CULTURA PURA DO FUNGO *Diplodia pinea* – CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO



NOTA: (1) **A:** CULTURA DE 7 DIAS. **B:** CULTURA DE 14 DIAS. **C:** CULTURA DE 21 DIAS. **D:** CULTURA DE 28 DIAS. **E:** CULTURA DE 35 DIAS

FONTE: O autor (2017)

Utilizando a técnica de CCD foi possível observar positividade para esteroides e triterpenos, polifenóis, flavonoides e alcaloides. Os resultados obtidos estão na tabela 5 que está representada em seguida.

TABELA 5 – RESULTADOS DA CCD A PARTIR DOS EXTRATOS METANÓLICO BRUTO da MASSA FÚNGICA PARA O *D. pinea*

Constituinte químico	Extrato MeOH bruto				
	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d
Esteroides e triterpenos	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+
Polifenóis	-	-	+	-	-
Alcaloides	+	+	+	+	+

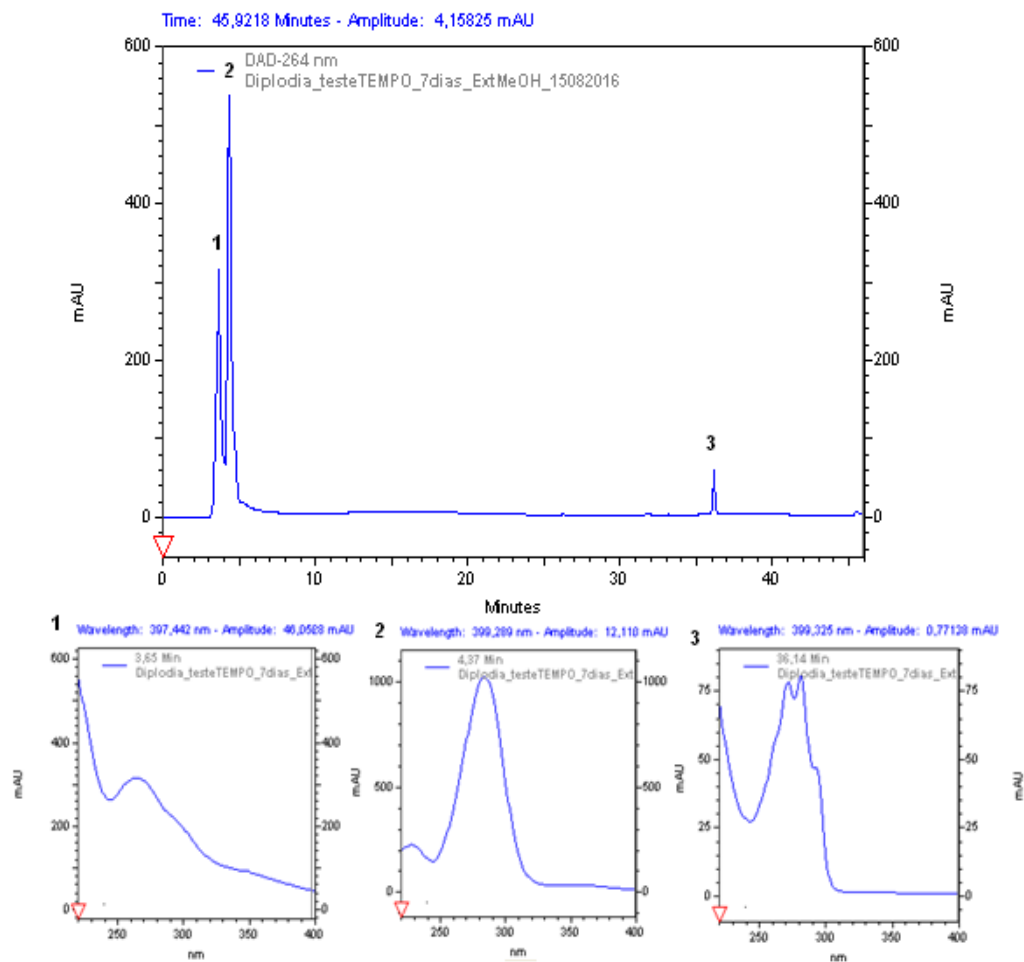
NOTA: (+) INDICA REAÇÃO POSITIVA; (-) INDICA REAÇÃO NEGATIVA

FONTE: O autor (2017)

Quanto ao perfil obtido em CLAE-UV, observou-se a presença de três picos majoritários em 7 dias, com grande intensidade, três picos muito semelhantes em 14 e 21 dias, quatro picos em 28 dias e dois picos em 35 dias.

Observou-se que os picos 1 e 2 estava presente em todas as amostras, sendo bem mais concentrados em 7 dias. Isso indica que metabólitos secundários diferentes podem ser obtidos dependendo do tempo de cultivo do fungo. Isso se pode justificar devidos às fases de crescimento do fungo bem como sua manutenção e sobrevivência. Desta maneira pode-se condicionar o meio, temperatura e tempo de cultivo para a produção e isolamento dos metabólitos secundários de interesse. Observaram-se os tempos de retenção pode-se afirmar que as substâncias secundárias de maior predominância exibiram um caráter polar e apolar, predominantes os picos em região polar, como já citado. Sugere-se que os tempos de 7 dias e 28 dias apresentaram maior interesse por poder conter substâncias só observadas nestes períodos de crescimento. Os cromatogramas em função do tempo estão demonstrados das figuras 20 a 24.

FIGURA 20 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÉLIO CULTIVADO EM MEIO BD– 7 DIAS DO FUNGO *Diplodia pinea*

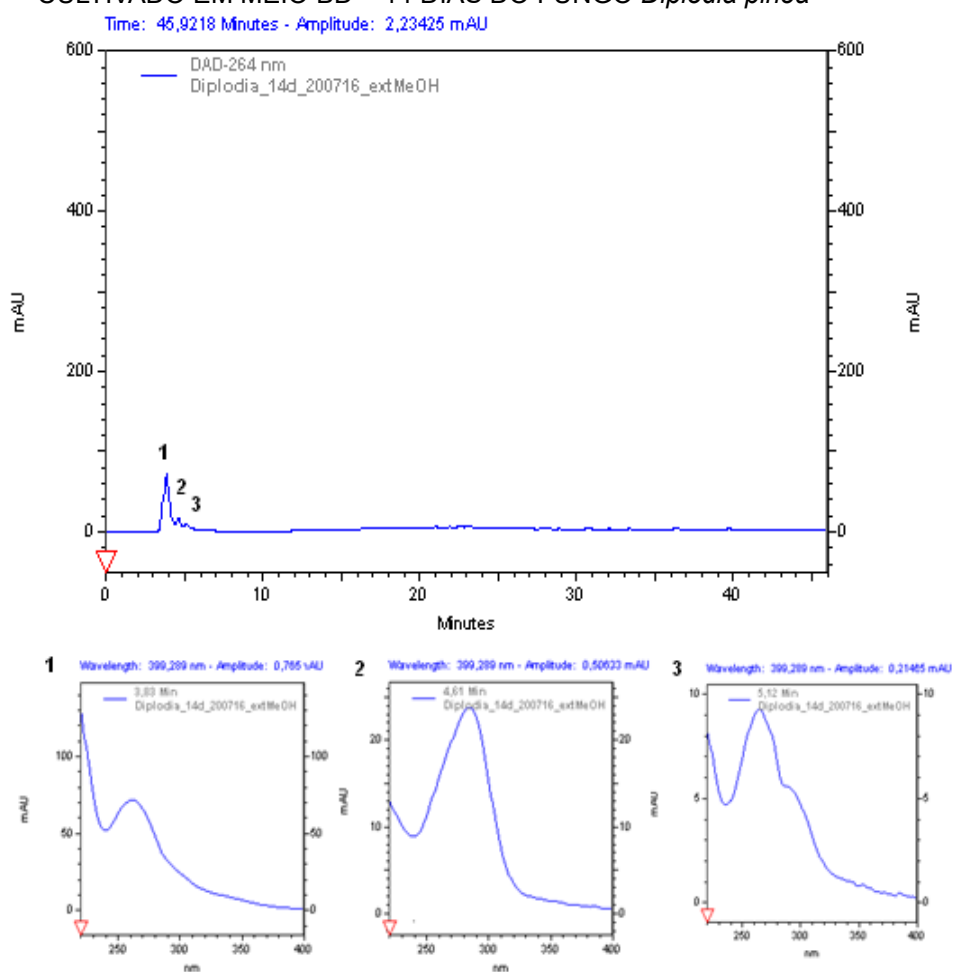


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,64	267
2	4,33	285
3	36,14	271;281

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

FIGURA 21 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÉLIO CULTIVADO EM MEIO BD – 14 DIAS DO FUNGO *Diplodia pinea*

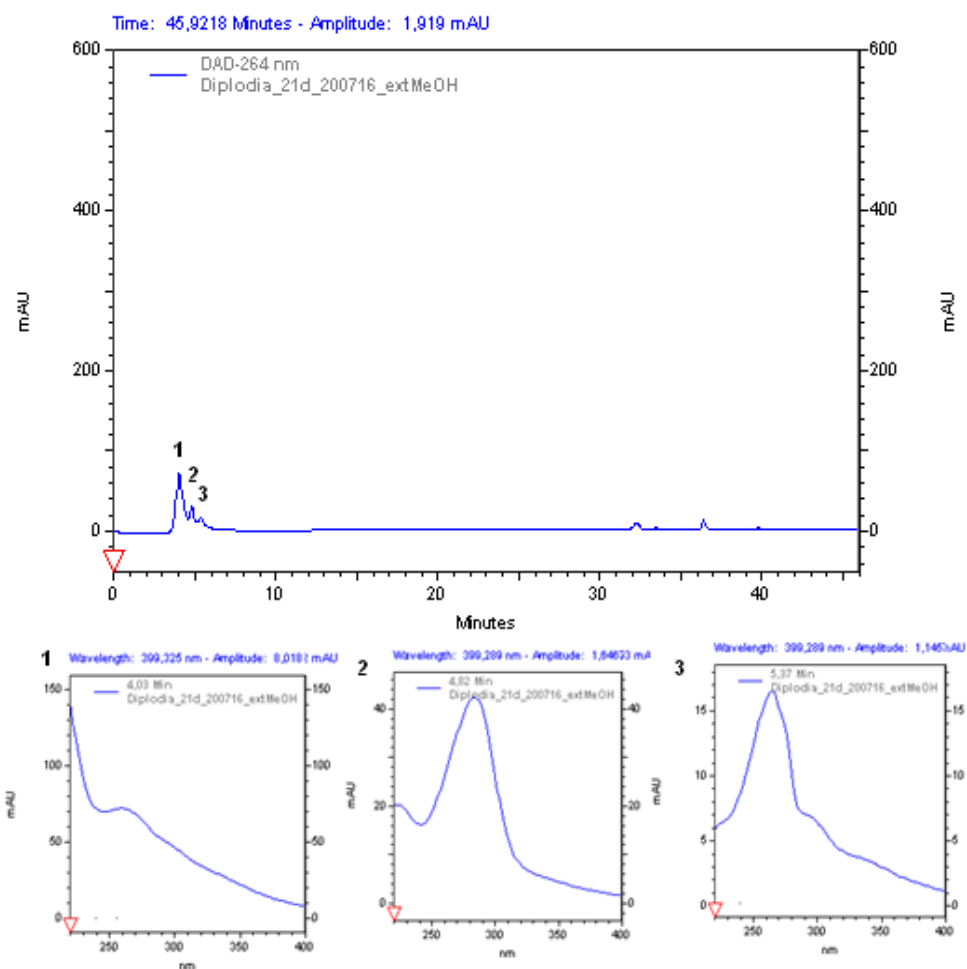


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,83	263
2	4,59	285
3	5,12	265

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

FIGURA 22 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÉLIO CULTIVADO EM MEIO BD – 21 DIAS DO FUNGO *Diplodia pinea*

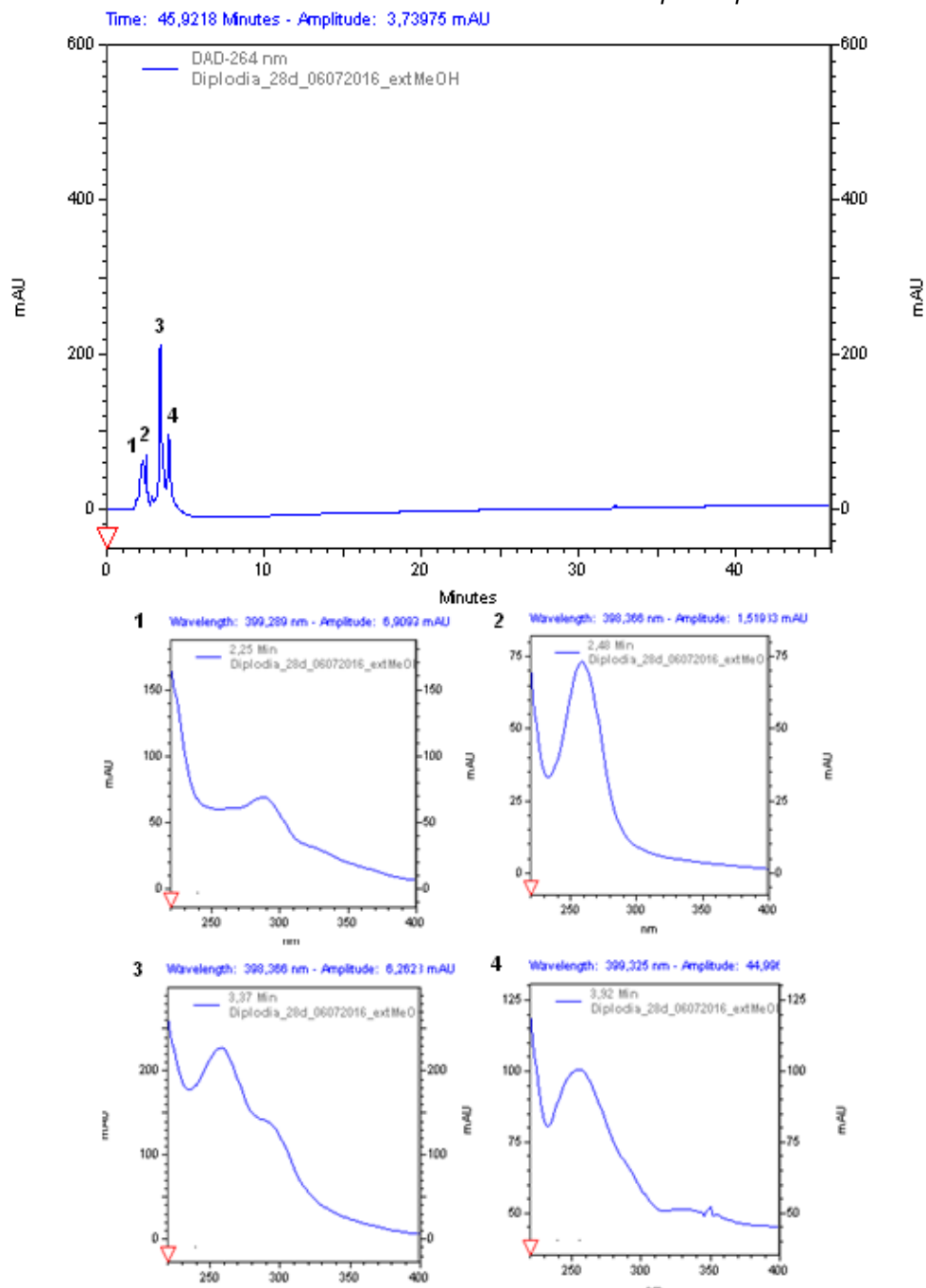


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	4,03	263
2	4,82	284
3	5,37	265

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

FIGURA 23 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÉLIO CULTIVADO EM MEIO BD – 28 DIAS DO FUNGO *Diplodia pinea*

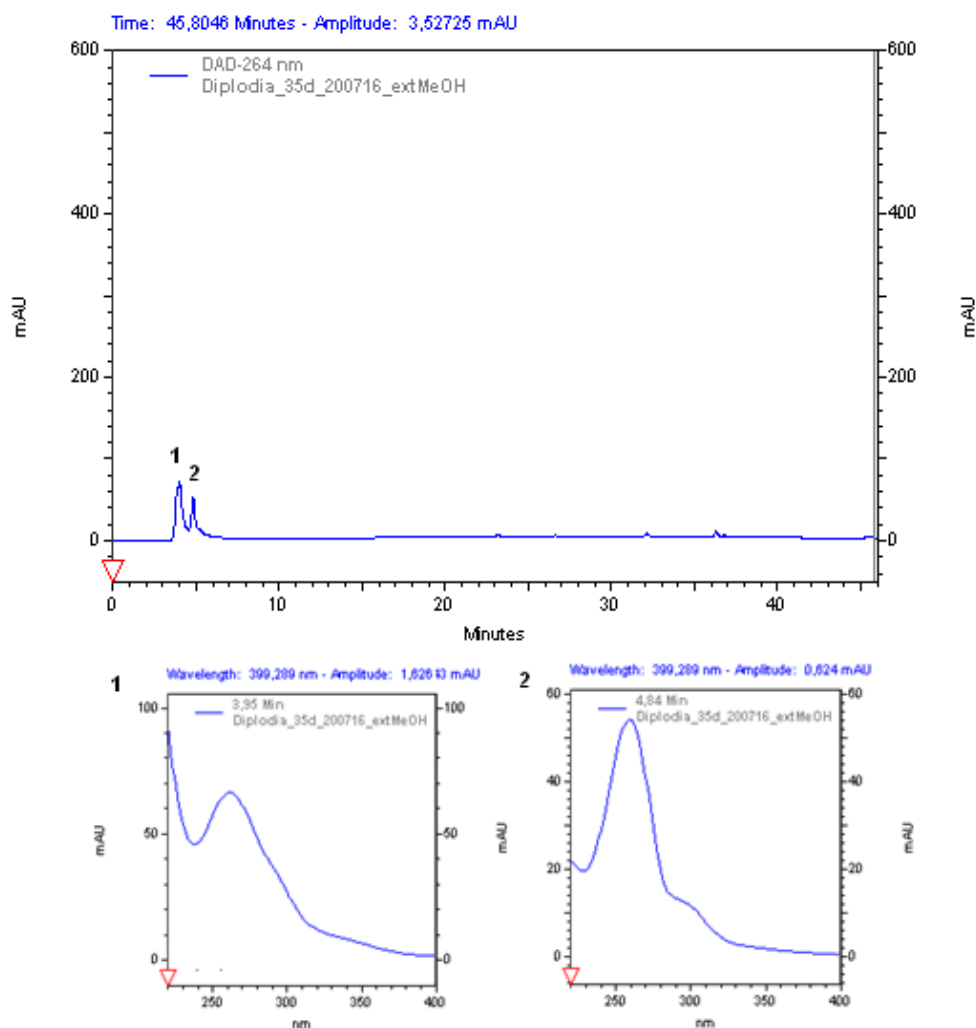


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	2,25	289
2	2,48	258
3	3,37	259;289
4	3,90	255

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

FIGURA 24 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO DO MICÊLIO CULTIVADO EM MEIO BD – 35 DIAS DO FUNGO *Diplodia pinea*



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,98	262
2	4,82	259

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
 FONTE: O autor (2017)

4.7 PRODUÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA BRUTO DO CALDO DE CULTIVO DE *Diplodia pinea*

A partir da análise das placas de CCD, constatou-se que para os fungos *Armillaria* sp. e *Botrytis cinerea*, não há mudança no padrão da cromatografia em camada delgada, observou-se o mesmo padrão de positividade em todos os meios. Para o fungo *Diplodia pinea*, entretanto não

se observou positividade para taninos em micélio crescido em Czapek. Sendo este meio rico e possuindo diversos componentes como sais e ferro, isso poderia estar inibindo a produção de determinados compostos por tornar o ambiente muito rico para o microrganismo. Sabe-se que se pode condicionar a produção de determinado metabólito secundário alterando as condições de cultivo e que situações de estresse mudam a sua produção de compostos pelo fungo. É possível afirmar que a constituição do meio influencia na produção de metabólitos secundários pelo microorganismo. A mudança da sua constituição, presença de sais e menor disponibilidade da fonte de carboidratos pode tornar o ambiente estressante, forçando o microorganismo a produzir substâncias de interesse para a sua manutenção. Dessa maneira os dados encontrados corroboram com a literatura que demonstrou isso para outros fungos como descrito por Gava (2002).

Os resultados obtidos na CCD estão representados na tabela 6.

TABELA 6- RESULTADOS DA CCD A PARTIR DO EXTRATO METANÓLICO BRUTO - MICÉLIO PARA OS FUNGOS PATOGENICOS

CCD Massa Fúngica	<i>Armillaria</i> sp.			<i>B. cinerea</i>			<i>D. pinea</i>		
	BD	Malte	Czapek	BD	Malte	Czapek	BD	Malte	Czapek
Esteroides e triterpenos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos e Polifenóis	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: (+) INDICA REAÇÃO POSITIVA; (-) INDICA REAÇÃO NEGATIVA

FONTE: O autor (2017)

Para o fungo *Diplodia pinea* o meio de cultivo foi submetido a uma extração com acetato de etila por particionamento e extrato foi analisado pela metodologia já descrita de CLAE-UV.

Para padronização e confirmação de que as substâncias encontradas foram produzidas pelo fungo e liberadas posteriormente em meio de cultivo, foi feito o controle dos três meios testados empregando-se a mesma metodologia do cultivo fúngico. Para estes foram realizadas as análises de CCD e CLAE-UV.

Nos resultados de CCD obteve-se positividade para esteroides e ou

triterpenos, flavonoides, polifenóis e ou taninos para os meios BD e malte, sendo o meio Czapek negativo para todos os compostos secundários. Isso indica que o meio em sua composição pode conter essas substâncias não se podendo garantir que a positividade para a CCD do fungo seja de compostos do mesmo. Os resultados estão dispostos na tabela 7.

TABELA 7 - CCD PARA OS CONTROLES DOS MEIOS TESTADOS

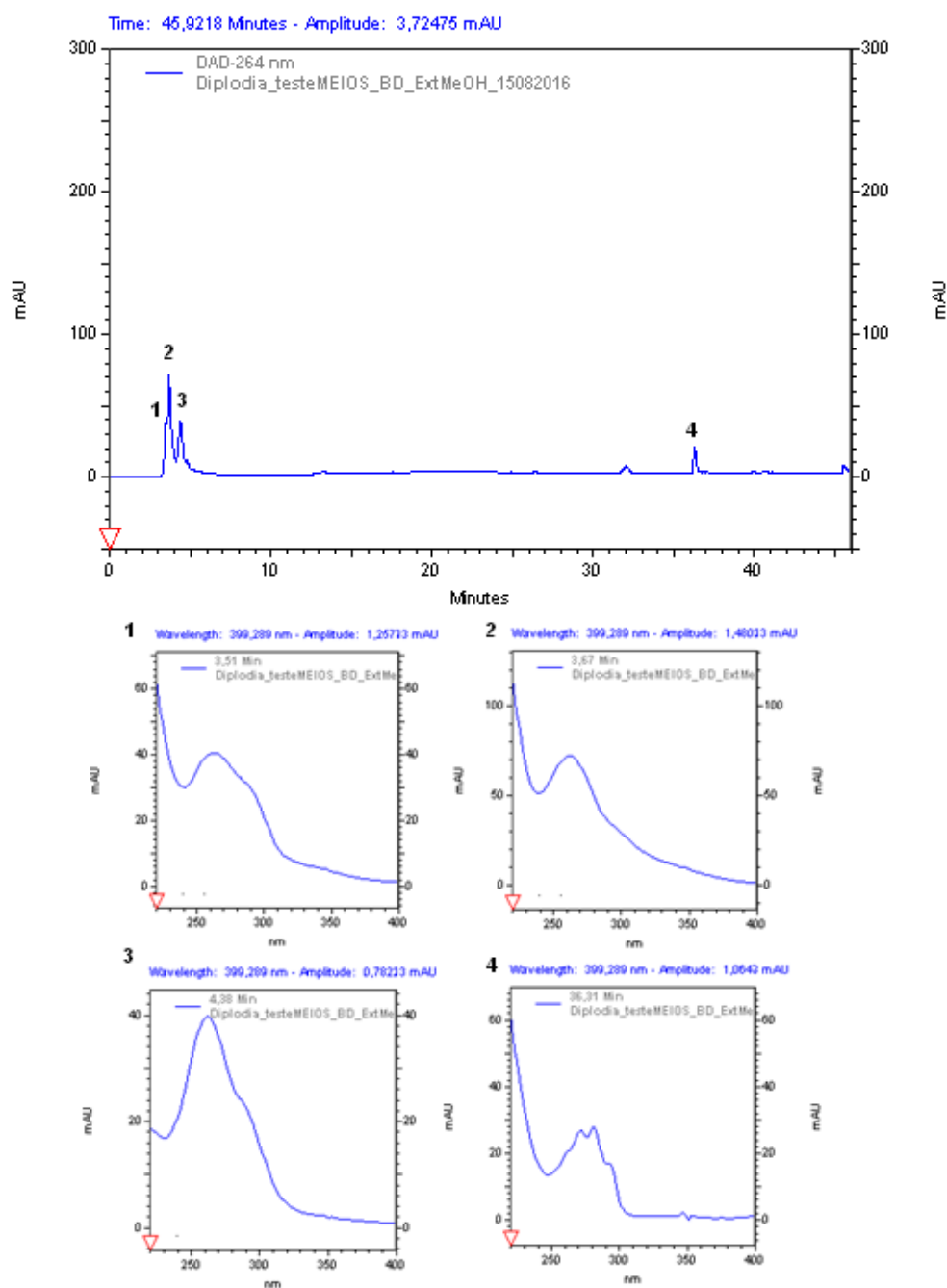
Constituinte químico	Meio BD	Meio Czapek	Meio Malte
Esteroides e triterpenos	+	-	+
Flavonoides	+	-	+
Taninos e Polifenóis	+	-	+
Alcaloides	-	-	-

NOTA: (+) INDICA REAÇÃO POSITIVA; (-) INDICA REAÇÃO NEGATIVA

FONTE: O autor (2017)

Conforme observado nas figuras 25 e 26, para o meio BD observaram dois picos com tempos de retenção próximos em ambos os cromatogramas (controle e fungo), porém para o fungo aparecem mais dois picos distintos, ausentes no controle e pode-se afirmar que essas substâncias representadas pelos picos 2 (composto de característica polar) e 4 (composto de característica apolar) são de substâncias produzidas pelo *D. pinea* sendo possível indicar que estas pertençam ao grupo de metabólitos mais polares e apolares, respectivamente, pelo seu tempo de retenção.

FIGURA 25 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO – MICÉLIO MEIO BD DO FUNGO *Diplodia pinea*

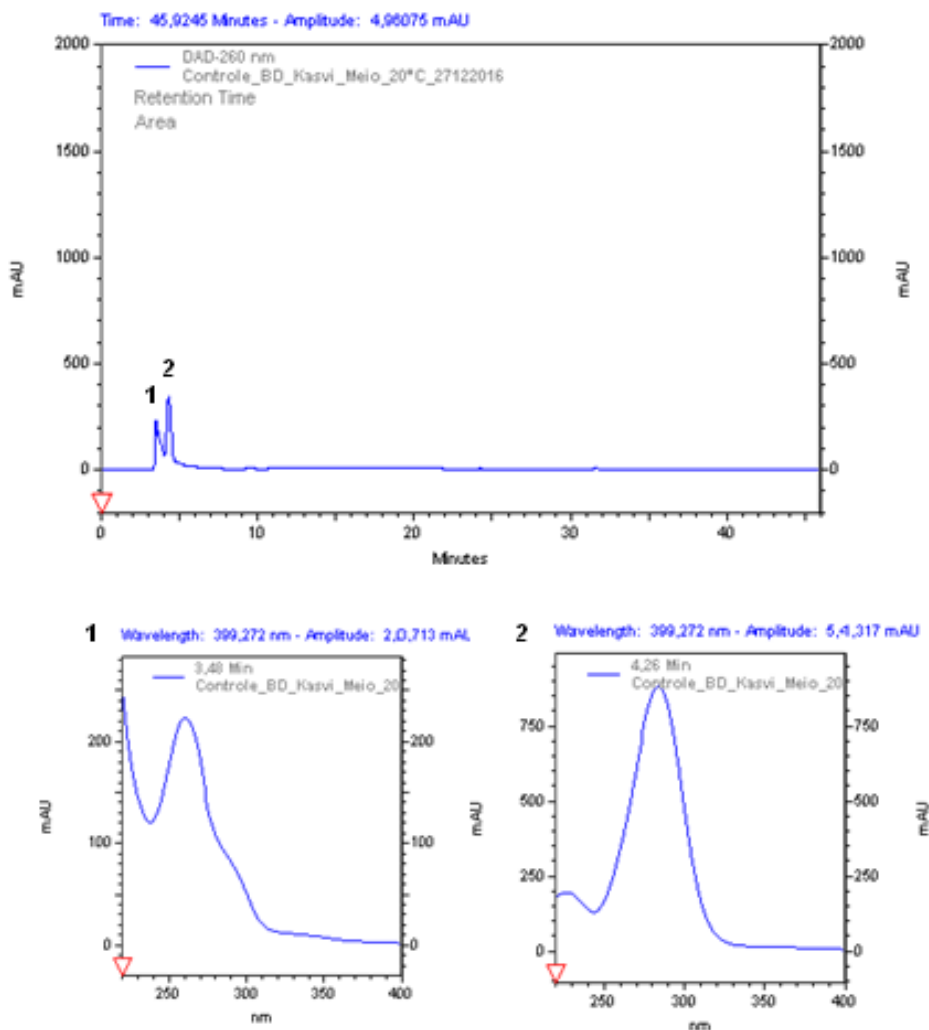


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,50	264
2	3,67	262
3	4,37	263
4	36,31	271;281

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

FIGURA 26 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O CONTROLE DO MEIO BD KASVI®



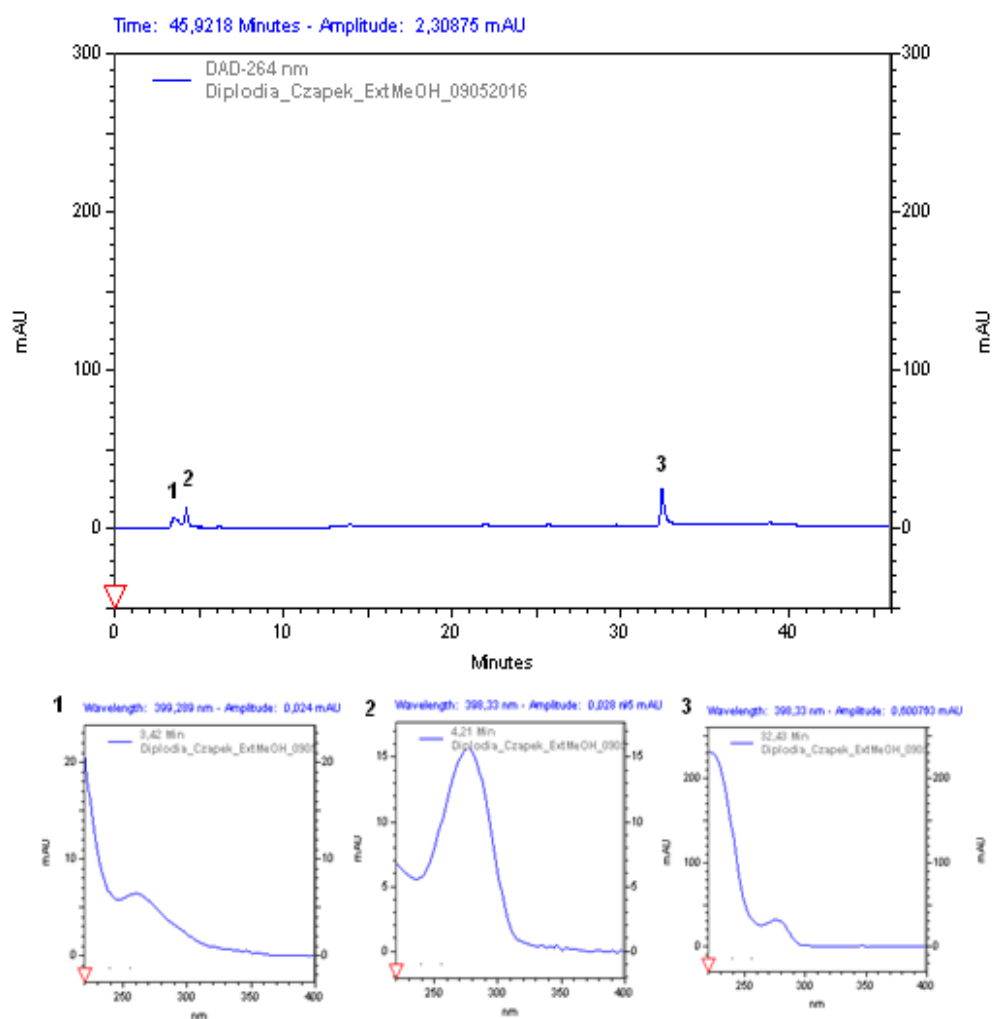
Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,48	261
2	4,26	226;284

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

Comparando-se o padrão dos cromatogramas das figuras 27 e 28, do patógeno com o do meio Czapek, observa-se a ausência total de picos para o controle. Comprova-se assim que os picos 1, 2 e 3, que aparecem no cromatograma do fungo, mesmo com intensidade reduzida, isso pode ter ocorrido devido a sua concentração, são compostos sintetizados e liberados no meio pelo fungo. Pela área do tempo de retenção que foram obtidos pode-se supor que esses metabólitos pertençam ao grupo de substâncias polares (1 e 2) e apolares (3).

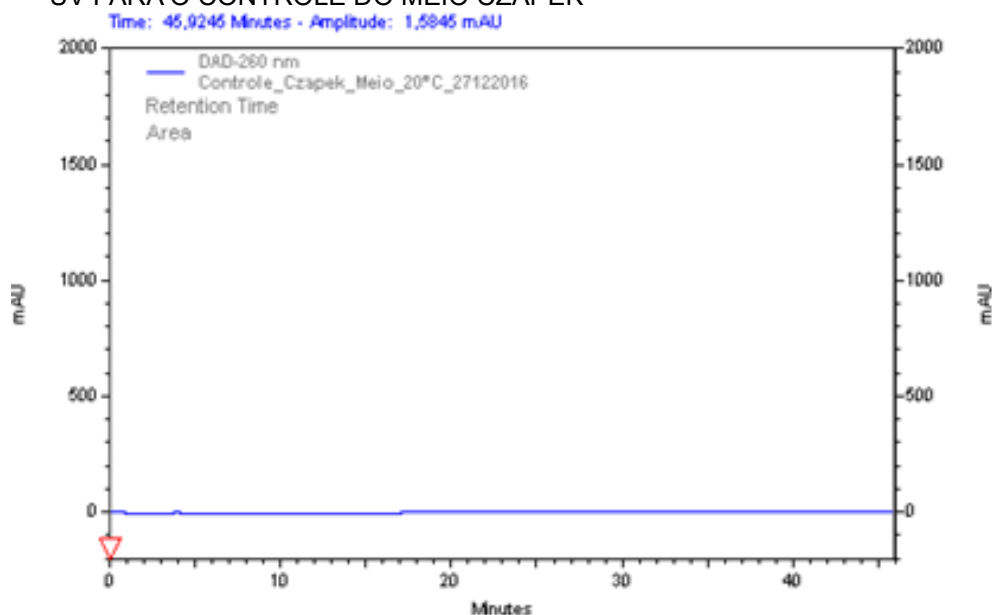
FIGURA 27 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO – MICÉLIO MEIO CZAPEK DO FUNGO *Diplodia pinea*



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,42	262
2	4,21	277
3	32,43	278

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
FONTE: O autor (2017)

FIGURA 28 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O CONTROLE DO MEIO CZAPEK

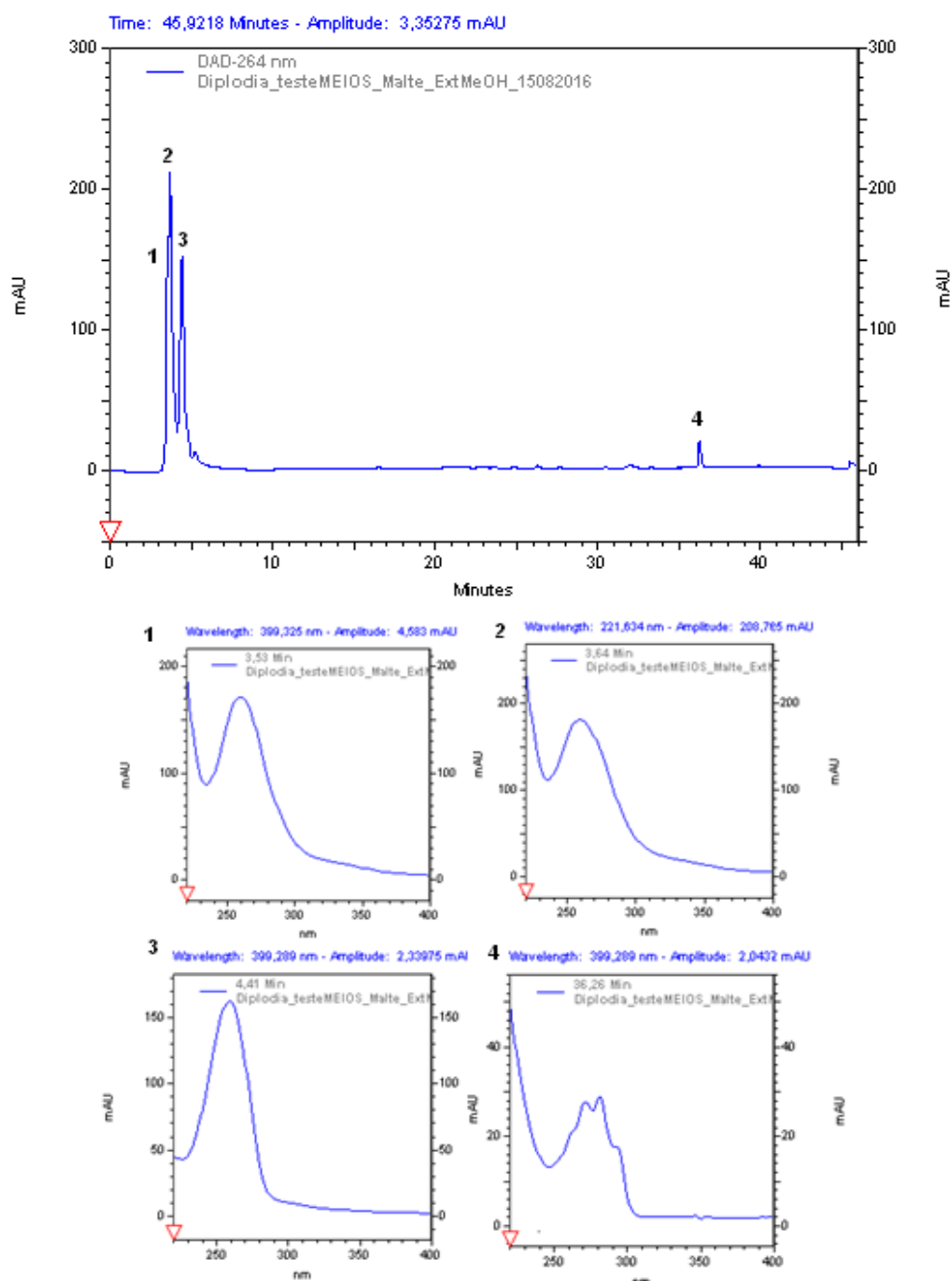


NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
FONTE: O autor (2017)

Comparando-se os cromatogramas 29 e 30 para o meio Malte, observa-se basicamente o mesmo padrão encontrado para o meio BD, exceto pela presença de um terceiro pico que não coincide com nenhum pico encontrado no cromatograma do fungo. Isso indica que há a presença de pelo menos duas substâncias produzidas exclusivamente pelo fungo, sendo estas representadas pelos picos 2 e 4 da figura 29. Avaliando posteriormente o tempo de retenção e a literatura essas substâncias provavelmente pertencem ao mesmo grupo de substâncias, sendo estas mais polares e apolares, respectivamente, pelo seu tempo de retenção.

Observa-se também que os picos dos cromatogramas do patógeno cultivados em meio BD e Malte são muito semelhantes, têm-se, porém uma diferença na intensidade dos picos indicando uma maior concentração dos compostos secundários quando o fungo é cultivado em meio malte.

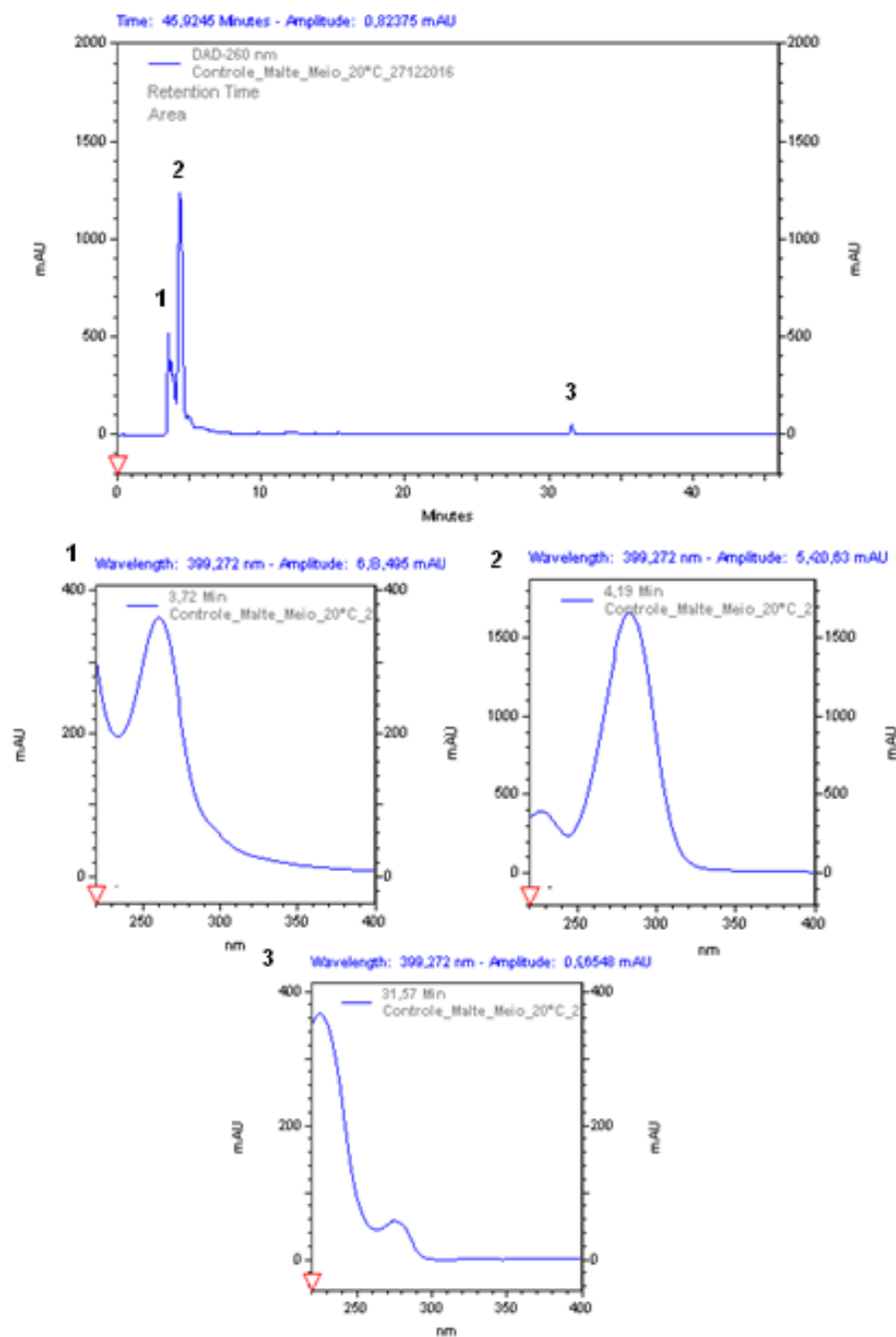
FIGURA 29 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O EXTRATO METANÓLICO BRUTO – MICÉLIO MEIO MALTE DO FUNGO *Diplodia pinea*



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,52	260
2	3,66	260
3	4,41	260
4	36,30	271;281

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
FONTE: O autor (2017)

FIGURA 30 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA O CONTROLE DO MEIO MALTE



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,63	260
2	4,31	229;283
3	31,57	226;278

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

Como exemplos de substâncias polares e apolares de interesse terapêutico pode-se citar os flavonoides como substâncias de caráter polar e

os alcaloides como metabólitos mais apolares, devido à suas estruturas químicas (BEHLING et al., 2004; SIMÕES, 2000).

4.8 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS EXTRATOS DE *Diplodia pinea* POR SOXHLET

Para o fungo *Diplodia pinea*, foi traçado um perfil por CCD e CLAE-UV de todas as suas temperaturas. O extrato foi obtido a partir da massa fúngica, por Soxhlet, sendo as frações finais hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol 50%/água 50%. A fração acetato de etila foi submetidas à cromatografia líquida para observação da presença dos grupos de metabólitos secundários.

Observa-se pelos resultados ilustrados da tabela 8, que em CCD obteve-se resultados sugestivos para algumas substâncias. Os esteroides e ou triterpenos apresentaram positividade nos extratos hexano, clorofórmio e acetato de etila, enquanto que para os extratos acetato de etila, metanol e etanol/água apontam positividade para flavonoides, taninos e polifenóis. Quanto aos alcaloides os resultados foram negativos em todas as frações e temperaturas.

TABELA 8 – RESULTADOS DA CCD A PARTIR DOS EXTRATOS OBTIDOS POR SOXHLET PARA O FUNGO *Diplodia pinea*

Constituinte químico	HX	CLO	Ac.Et	MeOH	Et50%/H ₂ O
Esteroides e triterpenos	+	+	+	-	-
Flavonoides e taninos	-	-	+	+	+
Polifenóis	-	-	+	+	+
Alcaloides	-	-	-	-	-

NOTA: (+) INDICA REAÇÃO POSITIVA; (-) INDICA REAÇÃO NEGATIVA

FONTE: O autor (2017)

Os extratos clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol50%/água50% foram submetidas à cromatografia de alta eficiência para observação de metabólitos secundários extraídos em cada um dos solventes, devido sua diferente polaridade e a especificidade do solvente para extrair o metabólito com determinada característica química. Observou-se, entretanto a presença de dois picos com características de substância

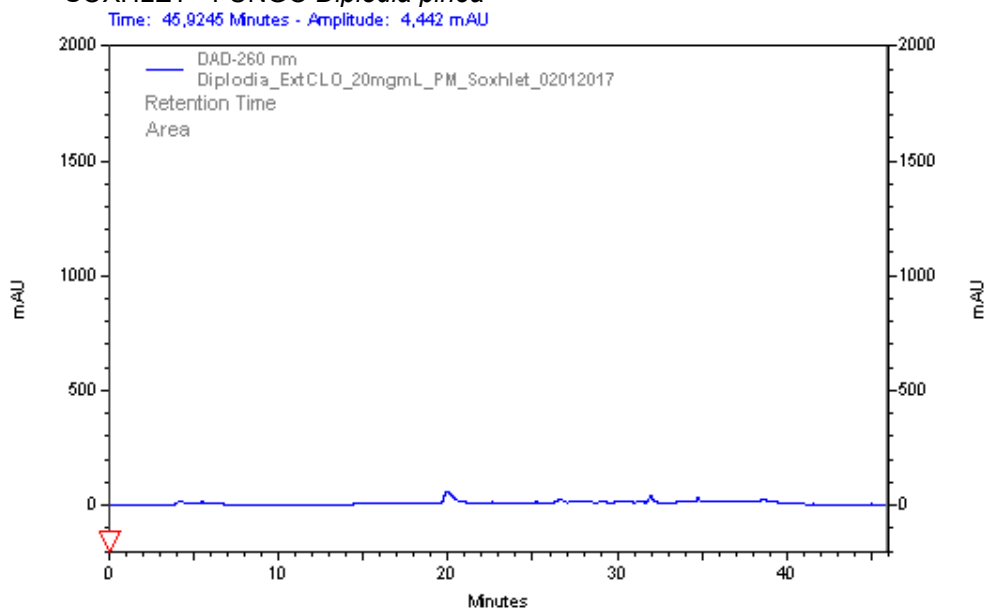
polar nos cromatogramas que apresentaram positividade.

Observou-se a ausência total de picos no extrato clorofórmio, reconhecida por extrair geralmente compostos de característica apolar como, por exemplo, os alcaloides.

Para os extratos acetato de etila, metanol e etanol 50%/água 50% obteve-se um padrão semelhante nos cromatogramas, porém o extrato metanólico apresenta grande intensidade da substância representada pelo pico 1. Essa característica se justifica, pois os álcoois tem o potencial de extrair um grupo vasto de substâncias de diferentes polaridades.

Os cromatogramas obtidos podem ser observados nas figuras 31 a 34.

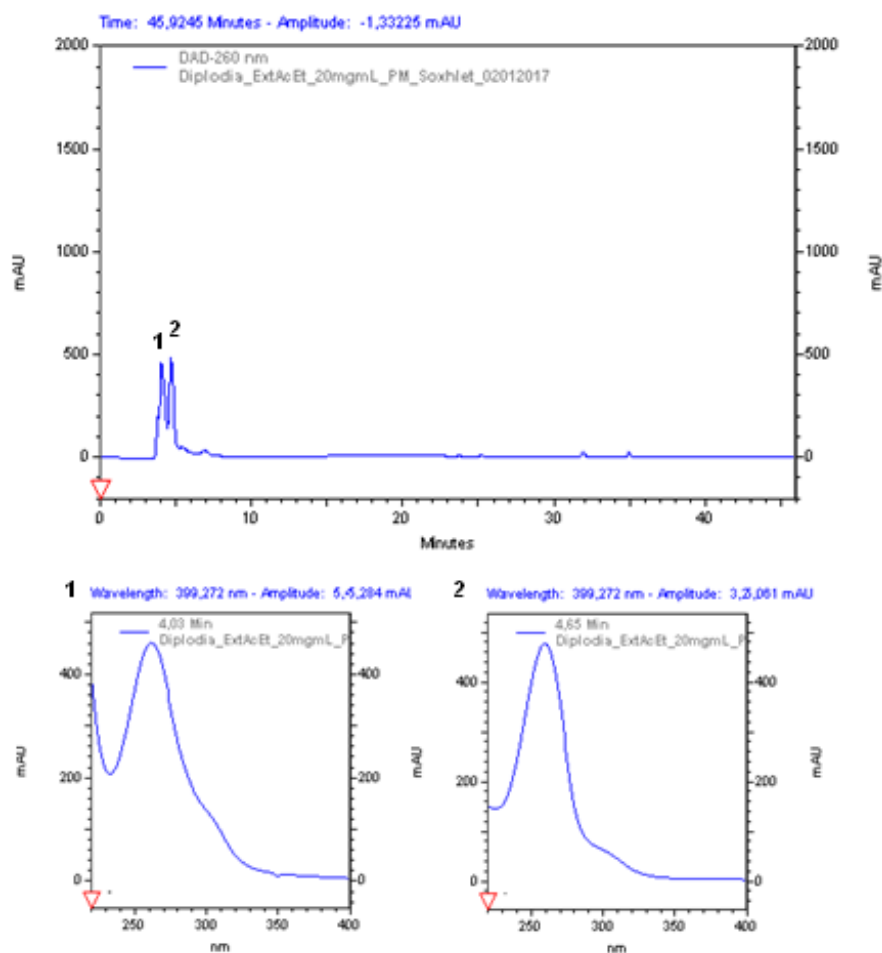
FIGURA 31 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA EXTRATO CLOROFÓRMIO DO MICÉLIO OBTIDO POR SOXHLET - FUNGO *Diplodia pinea*



NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

FIGURA 32 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MICÉLIO OBTIDO POR SOXHLET - FUNGO *Diplodia pinea*

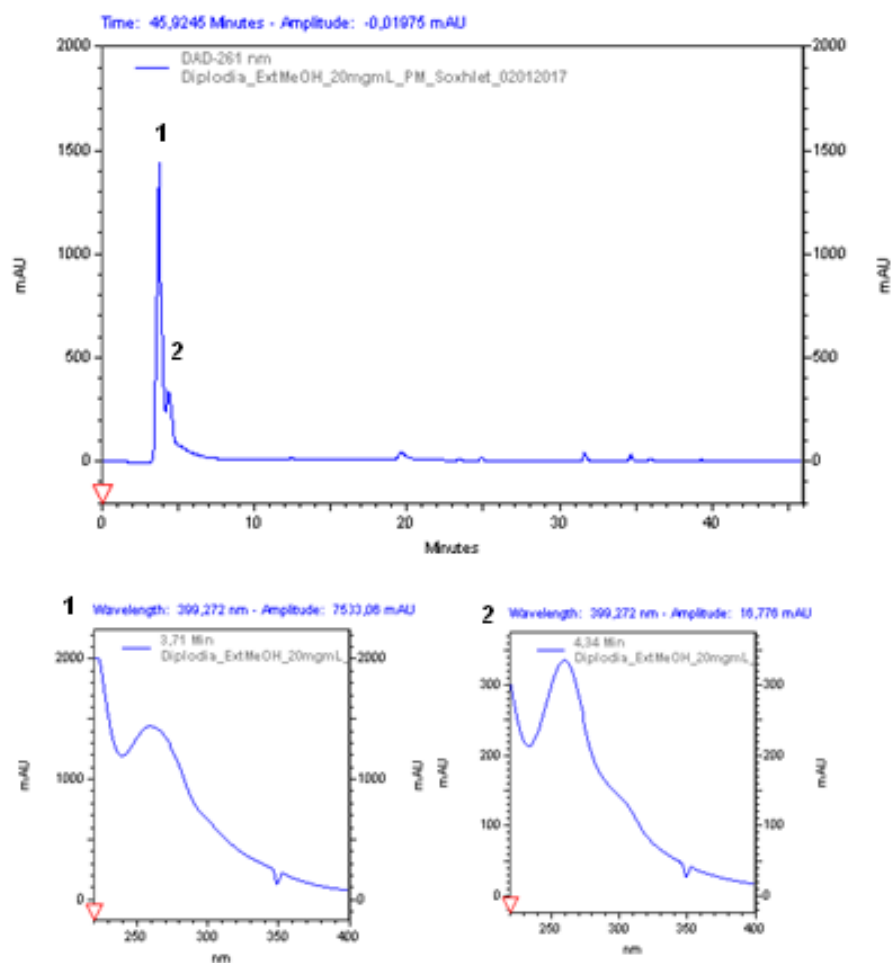


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	4,02	261
2	4,65	259

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

FIGURA 33 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA EXTRATO METANOL DO MICÉLIO OBTIDO POR SOXHLET MODIFICADO - FUNGO *Diplodia pinea*

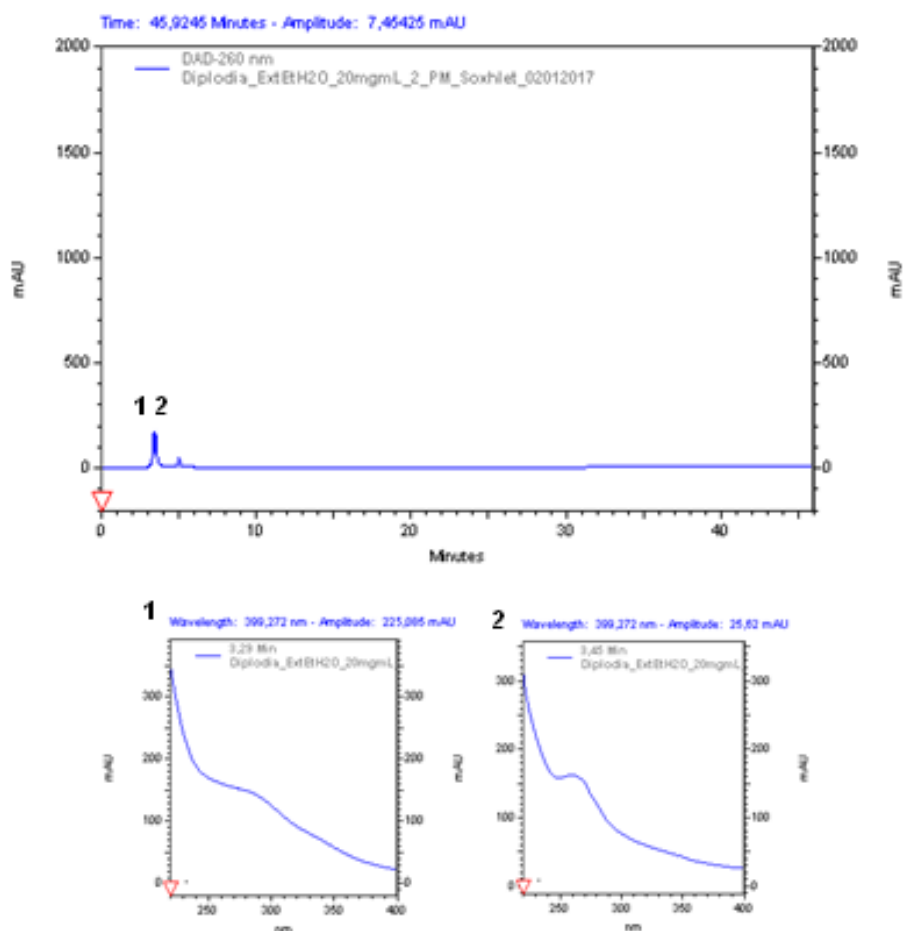


Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,71	261
2	4,34	261

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL

FONTE: O autor (2017)

FIGURA 34 – CROMATOGRAMA OBTIDO POR ANÁLISE DE CLAE-UV PARA EXTRATO ETANOL 50%/ÁGUA 50% DO MICÉLIO OBTIDO POR SOXHLET - FUNGO *Diplodia pinea*



Pico	Tempo de retenção (minutos)	UV (nm)
1	3,29	220; 284
2	3,43	220; 264

NOTA: FASE MÓVEL – MÉTODO GERAL
 FONTE: O autor (2017)

Todos os resultados encontrados pela técnica de CLAE-UV são compatíveis com o *screening* realizado por CCD. Em ambas as técnicas encontra-se positividade para metabólitos secundários de característica polar e apolar, indicando a provável presença de esteroides, polifenóis, cumarinas e flavonoides produzidos pelo fungo *Diplodia pinea*.

4.9 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A Cromatografia de Camada Delgada foi realizada para todos os extratos obtidos por metodologias diferentes. Os testes indicaram positividade marjoritária para os compostos secundários do grupo dos esteroides e triterpenos e polifenóis. Nos extratos metanólicos obteve-se positividade para flavonoides e alcaloides. Todos os solventes empregados apresentaram eficiência na extração de diferentes compostos de característica química distinta, o que torna esse um método viável e bem reproduzível. Sendo possível direcionar com o solvente a extração do metabólito que se tem interesse.

4.10 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-UV)

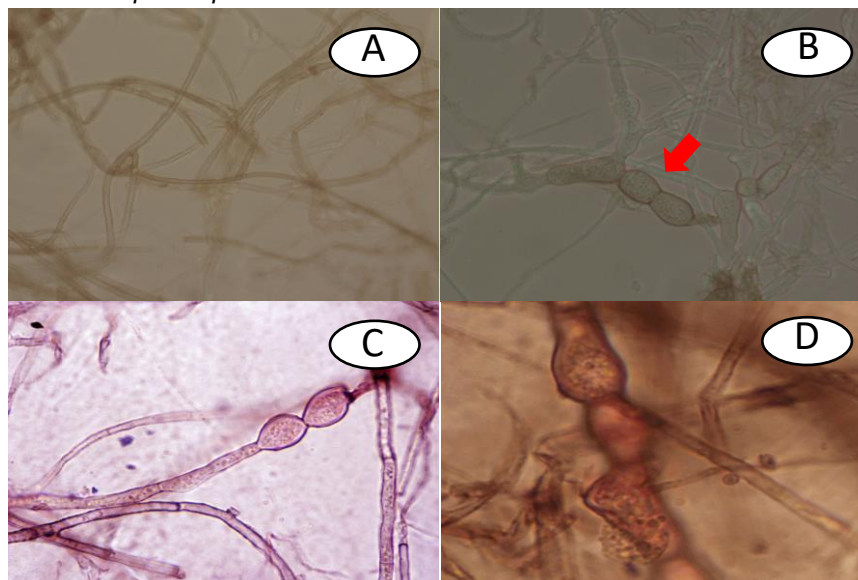
As análises por Cromatografia líquida de alta eficiência revelou um perfil semelhantes em todos os extratos testados. Primordialmente as análises demonstraram a presença de compostos polares e apolares, que alteram sua concentração em virtude das condições de cultivo do fungo, sendo possível otimizar a produção de determinado metabólito. Foi possível correlacionar os dados obtidos com a análise de CCD, encontrando-se um perfil compatível e confirmatório em ambas as análises para os mesmos composto secundários.

4.11 TESTES HISTOQUÍMICOS PARA O FUNGO *Diplodia pinea*

Os testes histoquímicos permitiram visualizar substâncias químicas no micélio *Diplodia pinea*. Foi possível observar (figura 35) colorações que sugerem a presença de alcaloides (A - indicada pela coloração marrom), lignina (B - indicada pela coloração avermelhada), polissacarídeos neutros (C - indicada pela coloração rosa escura) e terpenoides com grupo carbonila (D - indicada pela coloração alaranjada). A positividade encontrada nos testes histoquímicos é compatível com os resultados observados

previamente pela técnica de CCD.

FIGURA 35 – TESTES HISTOQUÍMICOS REALIZADOS PARA O FUNGO *Diplodia pinea*



NOTA: (1) **A** – positividade para alcaloides. **B** – positividade para lignina. **C** – positividade para polissacarídeos neutros. **D** – positividade para terpenóides.
FONTE: O autor (2017)

4.12 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE *Diplodia pinea*

Essas análises foram realizadas pela primeira vez para este isolado do fungo *Diplodia pinea*.

4.12.1 Determinação do teor de umidade

O resultado obtido na análise de umidade foi de 8,23% para o micélio liofilizado.

4.12.2 Determinação do teor de cinzas

O valor encontrado para as cinzas da biomassa liofilizada foi de 2,25% .

4.12.3 Determinação do potencial hidrogeniônico

Obteve-se o valor de 6,12 de pH para o fungo *Diplodia pinea*. Sendo que este apresenta um perfil próximo da neutralidade devido ao valor obtido, estudos anteriores não apontaram nenhuma aferição de pH para este patógeno.

A fermentação é utilizada pelos microrganismos, que transformam algumas matérias-primas em substâncias para seu uso. Deste modo a fermentação depende do crescimento dos fungos. Este crescimento pode ser afetado por diversos fatores como, por exemplo, o pH. Para todos os microorganismos dependendo de sua espécie e gênero, existem um pH mínimo de crescimento, sendo que estudos apontam que a maioria destes se desenvolvem bem e preferem pH próximos a neutralidade, o que ocorre no caso do patógeno em questão (UFRGS, 2017).

Na literatura encontramos em alguns artigos a aferição de pH associada a outras análises para caracterização de alguma atividade do fungo, como por exemplo o trabalho de Silva et al., 2016 que analisou o pH juntamente com a temperatura e atividade de uma enzima celulolítica. Ou a avaliação desse parâmetro em função do crescimento do fungo pelo seu tempo de cultivo do fungo (CARDOSO, ASSIS e NAHAS, 2009).

4.12.4 Determinação de proteínas totais

A média do valor gasto na titulação das amostras com ácido sulfúrico foi 18,53 mL. Obteve-se um valor de proteínas de 13,9% para o fungo.

4.12.5 Determinação de fibras brutas

A determinação de fibras brutas resultou em um valor de 27,8% para este patógeno.

4.12.6 Determinação do teor de lipídeos

Para a determinação de lipídeos, foi obtido um valor de lipídeos de 8,9 % para o fungo em análise.

Observa-se que as análises umidade, cinzas, proteínas, fibras e lipídeos, são realizados geralmente para fungos comestíveis. Mesmo assim, pouco se sabe a respeito da qualidade dos cogumelos comestíveis cultivados no Brasil, especialmente com respeito a essas análises. Na literatura internacional, os dados também são escassos (FURLANI e GODOY, 2007).

Os testes físico-químicos são relevantes para averiguar a composição do microorganismo. Os valores obtidos para este fungo são inéditos na literatura de maneira que só é possível compará-los com estudos anteriores que empregaram outros fungos. Os valores encontrados nos testes físico químicos são compatíveis com os descritos na literatura para fungos em geral. A composição centesimal das análises físico-químicas estão dispostas na tabela 9.

TABELA 9 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL – *Diplodia pinea*

Determinações	Resultados
Umidade	8,23%
Cinzas	2,25%
Proteínas	13,9%
Fibras brutas	27,8%
Lipídeos	8,9%
Carboidratos	38,92%
Total	100%

FONTE: O autor (2017)

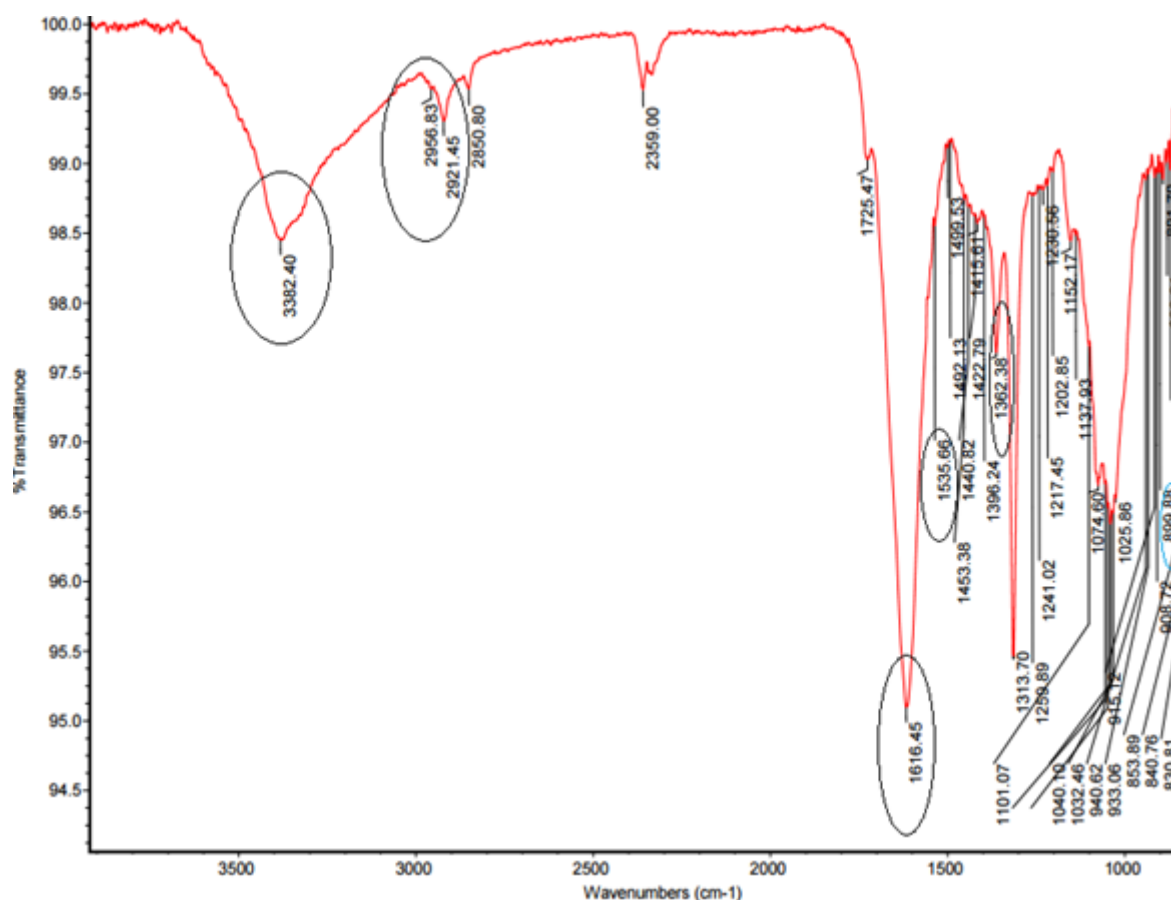
4.13 DETERMINAÇÃO DE QUITINA EM *Diplodia pinea*

Para a pesquisa de quitina o fungo apresentou um leve clareamento na sua cor original, sendo que não foi possível obter a quitina pura. Pela análise do Infravermelho observou-se os picos base da literatura que

indicam a presença da mesma, indicando que o fungo produz quitina. Na figura 36 observa-se o espectro obtido sendo que estão circulados os picos que são padrões de identificação descritos na literatura para quitina. Observou-se uma banda larga em torno de 3.400 cm^{-1} , que corresponde à vibração alongamento dos grupos hidroxilo, a banda em torno de 2.950 cm^{-1} representa o C - H simétrico, sendo a presença de bandas em 2.900 cm^{-1} representativas de quitina. A banda em torno de 1.657 cm^{-1} correspondente ao alongamento de amida C = O, enquanto a banda em torno de 1.564 cm^{-1} correspondente ao alongamento ou N - H da amida. As bandas em torno de 1380 cm^{-1} e 894 cm^{-1} corresponde à deformação simétrica de amida (Álvarez et al., 2014). Observa-se o aparecimento de outros picos, indicando que apesar de estar presente, essa substância não encontra-se pura na amostra.

O emprego de polímeros naturais tem amplas aplicações e é de vital importância no avanço das ciências, apresentando diversas vantagens como a sua fácil obtenção, sua biocompatibilidade e o fato de ser biodegradável. Os polissacarídeos, como a quitina, são extremamente bioativos, são obtidos geralmente de derivados de produtos agrícolas, crustáceos ou fungos. Sendo a precursora da quitosana, que é um polímero muito importante devido a sua ampla aplicabilidade. Dentre estas pode-se destacar sua aplicação na área alimentícia, biotecnológica, ciência de materiais, produtos farmacêuticos, agricultura, proteção ambiental entre outros (AZEVEDO et al., 2007).

FIGURA 36 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO OBTIDO PARA ANÁLISE DE QUITINA DO FUNGO *Diplodia pinea*



FONTE: O autor (2017)

4.14 PESQUISA DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM *Diplodia pinea*

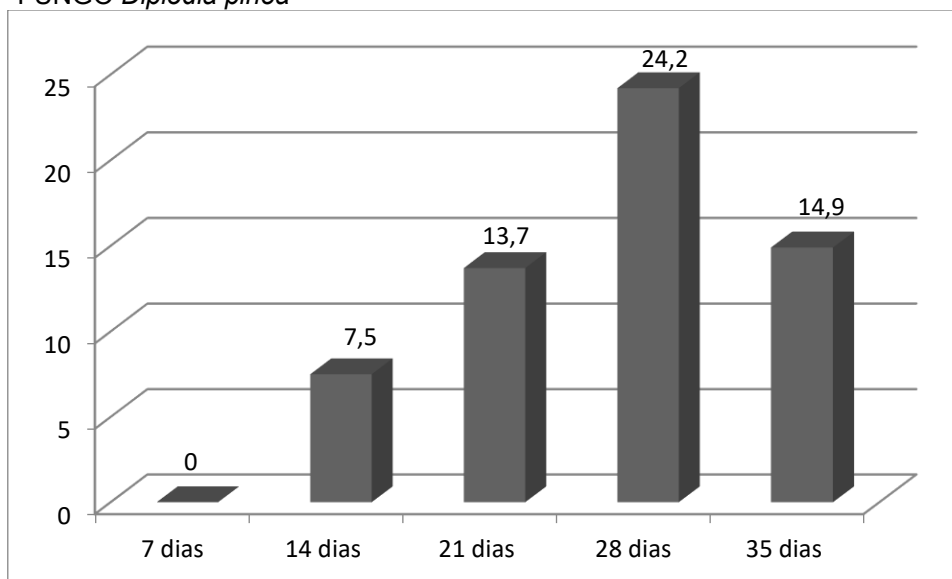
A pesquisa de exopolissacarídeos foi realizada com o meio não concentrado e concentrado dos tempos de cultivo 7, 14, 21, 28 e 35 dias para avaliar a produção desta substância que está ilustrada nos gráficos 8 e 9.

Observou-se a presença de exopolissacarídeos em todos os tempos de cultivo para o meio não concentrado, exceto para 7 dias. Para o meio concentrado em todos os períodos de tempo observou-se a precipitação dos exopolissacarídeos. Observou-se uma concentração superior desta substância nas amostras de meio concentrado em comparação com o meio não concentrado, isso ocorre obviamente, pela concentração do meio proporcionar uma maior quantidade do composto. Foi possível o isolamento

da substância pela sua precipitação com etanol e consequente filtragem.

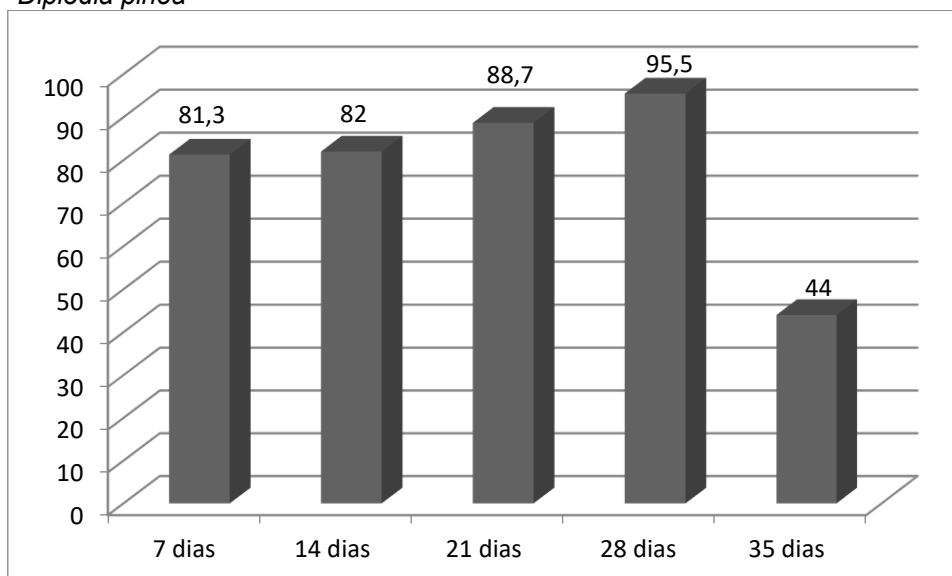
O teor de polissacarídeos em mg encontrado bem como seu aumento e declínio em função do tempo de cultivo está expresso nos gráficos 8 e 9, respectivamente.

GRÁFICO 8 - RESULTADOS GRÁFICOS OBTIDOS NO TESTE DE EXOPOLISSACARÍDEOS – MEIO NÃO CONCENTRADO EM mg PARA O FUNGO *Diplodia pinea*



FONTE: O autor (2017)

GRÁFICO 9 - RESULTADOS GRÁFICOS OBTIDOS NO TESTE DE EXOPOLISSACARÍDEOS – MEIO CONCENTRADO EM mg PARA O FUNGO *Diplodia pinea*



FONTE: O autor (2017)

Já é descrito na literatura que alguns fungos secretam exopolissacarídeos sobre sua superfície o que aumenta consideravelmente a viscosidade do meio (COVIZZI, 2007). Isso foi observado para os meios de cultivo de *D. pinea*. Os exopolissacarídeos envolvem as hifas conferindo um suporte a mesma, isso pode melhorar a resistência mecânica e a eficiência da imobilização, parâmetros importantes para escolha do suporte de imobilização da célula microbiana. Durante o crescimento do fungo é importante essa produção e ocorre exponencialmente até a fase de estabilização do microorganismo. Inicia-se uma fase de consumo desse polissacarídeo o que resulta por fim no início de declínio do mesmo (COVIZZI, 2007).

4.15 TESTES BIOLÓGICOS

4.15.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE *Diplodia pinea*

4.15.1.1 Frente à *Artemia salina*

A toxicidade frente à *Artemia salina* pôde ser visualizada no extrato do meio extraído com acetato de etila e fortemente no extrato hexano, já que este, em todas as concentrações, foi tóxico para mais da metade das amostras. Os dados do ensaio bem como a CL50 inferior 1000 µg.mL⁻¹ do meio podem ser vistos na tabela 10.

TABELA 10 – ANÁLISE ESTATÍSTICA – TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO (µg.mL ⁻¹)					CL50 (µg.mL ⁻¹)	IC de 95% (µg.mL ⁻¹)
	10	100	250	500	1000		
HEX	MORTALIDADE					<10	-
	19	21	22	23	25		
CLO	6	7	13	13	15	> 1000	-
AC.ET	6	10	11	14	12	> 1000	-
MEOH	8	8	7	11	10	> 1000	-
ETOH/H2O	12	12	12	12	14	> 1000	
MEIO	4	13	12	14	19	408,97	192,04 – 1455,97
CONTROLE SDS	CONCENTRAÇÃO (µg.mL ⁻¹)					24,74	1,349 – 1,551
	10	20	30	40	50		
	MORTALIDADE						
	3	5	10	19	23		

FONTE: O autor, 2017

Dentre os ensaios de toxicidade o sobre *Artemia salina* pode ser facilmente realizado por inúmeras vantagens como baixo custo e rapidez. A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada sendo que seus ovos eclodem facilmente. Inúmeros trabalhos encontrados na literatura relacionam a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como a antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida e tripanossomicida (SIQUEIRA et al., 1998).

4.15.1.2 Teste da atividade hemolítica

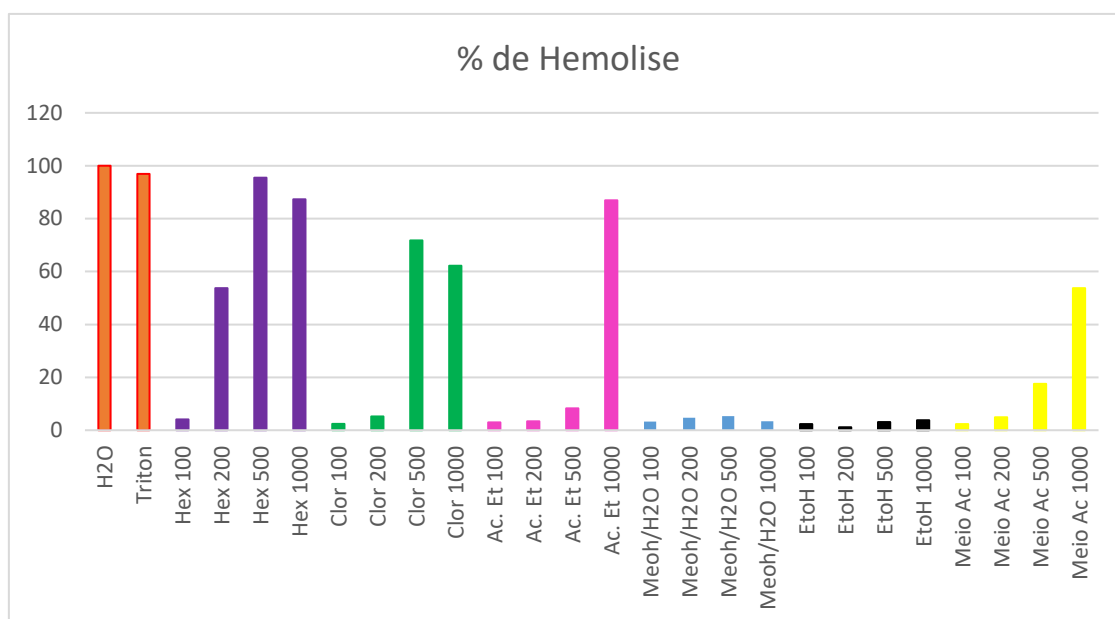
Os testes da atividade hemolítica foram realizados por duas metodologias diferentes e revelaram toxicidade para alguns extratos do fungo *Diplodia pinea*. Os resultados estão dispostos nos itens a seguir.

4.15.1.2.1 Teste da atividade hemolítica com hemácias em suspensão

Com base nos resultados obtidos observou-se intensa atividade hemolítica no extrato hexano nas concentrações de 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, sendo que a sua capacidade de hemólise chega perto dos controles positivos. Isso também ocorre no extrato acetato de etila com concentração de 1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Para esses extratos a atividade ocorreu em uma faixa de 86,9% a 95,5%, os controles representam 100% de hemólise.

Os extratos hexano na concentração de 200 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, clorofórmio 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e meio 1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, apresentaram taxas de hemólise bem consideráveis sendo estas as de 53,7%, 71,7%, 62,2% e 53,7%, respectivamente.

Para todos os extratos com esses valores de atividade hemolítica consideramos que estes possuem toxicidade. Estudos como os de Dewick, 2005, Silva 1999 e Monteiro et al. 2005, apontam que toxicidade pode estar ligada a presença de metabólitos secundários como os alcaloides e os taninos. A literatura afirma que diversas plantas reconhecidamente tóxicas possuem alcaloides em sua composição. O gráfico bem como análise estatística para esse teste podem ser visualizados no gráfico 10 e tabela 11.

GRÁFICO 10 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA NOS EXTRATOS DE *Diplodia pinea*

FONTE: O autor, 2017

TABELA 11 – ANÁLISE ESTATÍSTICA – ATIVIDADE HEMOLÍTICA

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)	% HEMÓLISE	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN															
H ₂ O	-	100	a															
Triton	-	96,91	b															
EHEX	100	4,08												k	l			
	200	53,71						g										
	500	95,48		c														
	1000	87,31			d													
ECLO	100	2,40															n	
	200	5,21									j							
	500	71,76				e												
	1000	62,19				f												
EAC.ET	100	2,96													m	n		
	200	3,37												l	m			
	500	8,27								i								
	1000	86,93			d													
EET/H ₂ O	100	3,27														m		
	200	4,67									j	k						
	500	5,34									j							
	1000	3,34												l	m			
EMEOH	100	2,32														n		
	200	1,12															o	
	500	3,09													m	n		
	1000	3,78												l	m			
EMEIO	100	2,32														n		
	200	4,90									j							
	500	17,54							h									
	1000	53,71						g										

NOTA: AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE

FONTE: O autor (2017)

4.15.1.2.2 Teste de atividade hemolítica em placas de ágar sangue

No estudo de atividade hemolítica em placa todos os extratos foram considerados negativos devido à ausência de qualquer halo de inibição. Isso pode ser justificado devido ao fato das frações com atividade hemolítica pela metodologia de hemácias em suspensão tinham caráter lipofílico, substâncias com essa característica não conseguem permear o ágar gerando posteriormente um resultado falso negativo.

Dessa maneira a reação de hemólise não ocorre e

consequentemente não há formação do halo de inibição.

Devido a essa importância e as futuras aplicações possíveis para o fungo estudado a sua toxicidade foi analisada por três metodologias diferentes, sendo essas: frente à *Artemia salina*, hemólise com hemácias em suspensão e hemólise em placas de ágar sangue, concluindo-se pelos testes realizados que o fungo *Diplodia pinea* é tóxico.

4.15.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Diplodia pinea*

Nenhum dos extratos testados teve atividade antimicrobiana expressiva foram classificadas entre moderada, fraca ou inativa de acordo com a tabela 12. Não houve a necessidade de realizar a técnica de *Checkboard*. Os resultados obtidos dos extratos frente às cepas testadas estão na tabela 13.

TABELA 12 – PARAMETROS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PARA O TESTE DE CIM	
CONCENTRAÇÃO	ATIVIDADE INIBITÓRIA
Até 100 µg/mL ⁻¹	BOA
100 – 500 µg/mL ⁻¹	MODERADA
500 – 1000 µg/mL ⁻¹	FRACA
Maior que 1000 µg/mL ⁻¹	INATIVA

FONTE: SOUZA, 2013

A atividade antimicrobiana foi realizada para constatar se o microorganismo em estudo possui atividade contra outros patógenos de interesse para área de saúde humana.

Foram testados os extratos obtidos por Soxhlet contra cepas sendo que atividade foi considerada satisfatória para frações que apresentaram inibição dos microorganismos a uma concentração inferior a 100µL devido ao seu potencial interesse clínico (SOUZA, 2013).

TABELA 13 – RESULTADOS OBTIDOS PARA ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE *Diplodia pinea* FRENTE ÀS CEPAS TESTADAS

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
Extrato HX	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato CLO	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	500 µg/ml
Extrato Ac.Et	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato MeOH	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato EtOH/H₂O	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato Meio PM	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028)	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053
Extrato HX	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato CLO	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato Ac.Et	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato MeOH	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato EtOH/H₂O	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml	>1000 µg/ml
Extrato Meio PM	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml	1000 µg/ml

FONTE: O autor (2017)

Como observado nos resultados somente o extrato clorofórmio contra a cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 apresentou atividade moderada, sendo que todos os outros extratos apresentaram atividade fraca obtendo-se atividade em 1000 µg.mL⁻¹ ou acima desta concentração. Sendo que para interesse clínico seriam necessárias grandes quantidades de extrato para efetiva atividade.

4.15.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Diplodia pinea*

Para avaliação do potencial antioxidante dos extratos que apresentaram atividade no teste de *screening* foram realizados os testes de redução do radical do DPPH, método do Folin Ciocalteau e Fosfomolibdênio.

4.15.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH

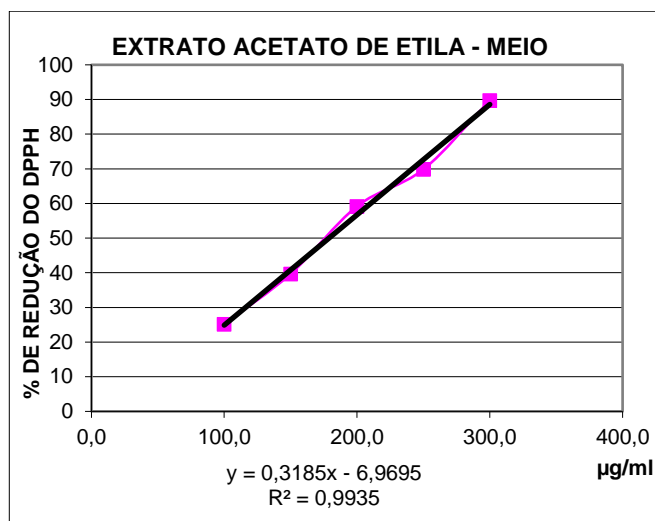
Os resultados podem ser exemplificados na figura 37 e visualizados nos gráficos 11, 12 e 13 seguidos da tabela 14, sendo a IC₅₀ das frações de 178,8 (acetato de etila meio), superior a 500 (acetato de etila massa) e 176,1 (ET/H₂O) respectivamente. Comparando-se com os padrões de Vitamina C e Rutina observou-se que a atividade antioxidante pôde ser considerada baixa, mesmo para as frações que apresentaram atividade no *screening*.

FIGURA 37 – REDUÇÃO DO RADICAL DPPH FRENTE A EXTRATO ACETATO DE ETILA



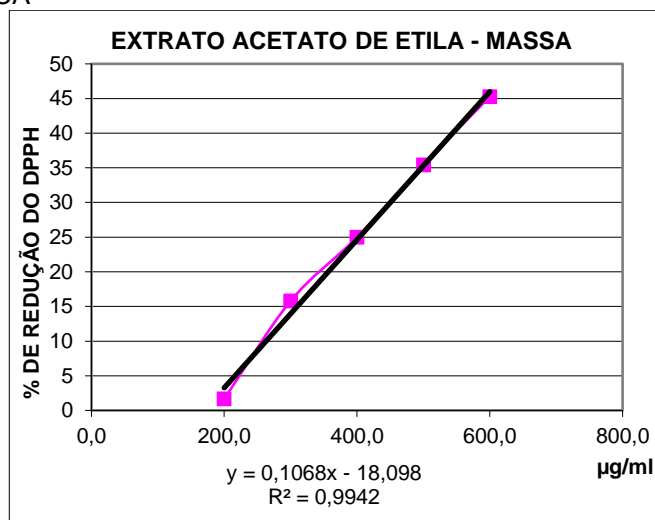
FONTE: O autor, 2017

GRÁFICO 11 – REDUÇÃO DO RADICAL DPPH EM FUNÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DO MEIO



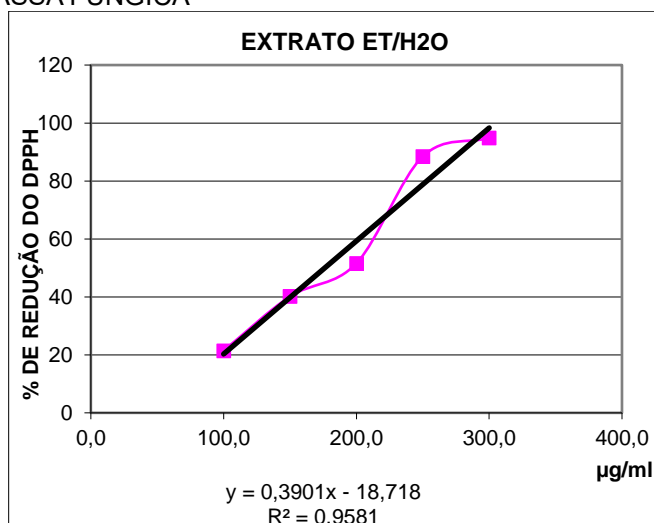
FONTE: O autor, 2017

GRÁFICO 12 – REDUÇÃO DO RADICAL DPPH EM FUNÇÃO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA MASSA FÚNGICA



FONTE: O autor, 2017

GRÁFICO 13 – REDUÇÃO DO RADICAL DPPH EM FUNÇÃO DO EXTRATO ETANOL/ÁGUA DA MASSA FÚNGICA



FONTE: O autor, 2017

TABELA 14 – DADOS ESTATÍSTICOS, PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO A VITAMINA C E A RUTINA AA(%) + DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN		
VIT C	4,94 ± 0,06	a		
RUT	6,15 ± 0,08	a		
HEX	>500			c
CLO	>500			c
AC.ET	>500			c
ET/H2O	176,14 ± 1,64		b	
MEOH	>500			c
MEIO	178,82 ± 1,3		b	

NOTA: AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE

FONTE: O autor (2017)

4.15.3.2 Avaliação de Polifenóis Totais pelo método de Folin Ciocalteu

Esse método foi realizado com amostras em triplicata sendo empregado o reagente de Folin Ciocalteu. Os metabólitos secundários que possuem atividade positiva na análise de Folin Ciocalteu são os ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, fenóis simples, ligninas, lignanas, taninos hidrolisáveis e condensados (OLIVEIRA, 2015). Os resultados podem ser

visualizados na tabela 15.

TABELA 15 – FENÓIS TOTAIS PRESENTES EM DIFERENTES EXTRATOS DE *Diplodia pinea*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (mg EAG. g ⁻¹ DA AMOSTRA) + DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN				
EHEX	29,432 ±0,04					f
ECLO	79,496±0,008			c		
EAC.ET	50,585±0,04				e	
EMEIOH	63,233±0,002				d	
EET/H2O	95,121±0,007		b			
EMEIO	126,9±0,014	a				

NOTA: AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE

FONTE: O autor (2017)

Baseando-se nos resultados encontrados, pode-se afirmar que todos os extratos analisados apresentaram alta concentração de fenóis totais, indicando uma ótima atividade dos extratos. A maior concentração desses compostos foi encontrada no extrato etanol/água e a menor concentração no extrato hexano. Isso ocorre devido a polaridade do solvente, o que altera sua capacidade de extrair os compostos fenólicos.

4.15.3.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do Fosfomolibdênio

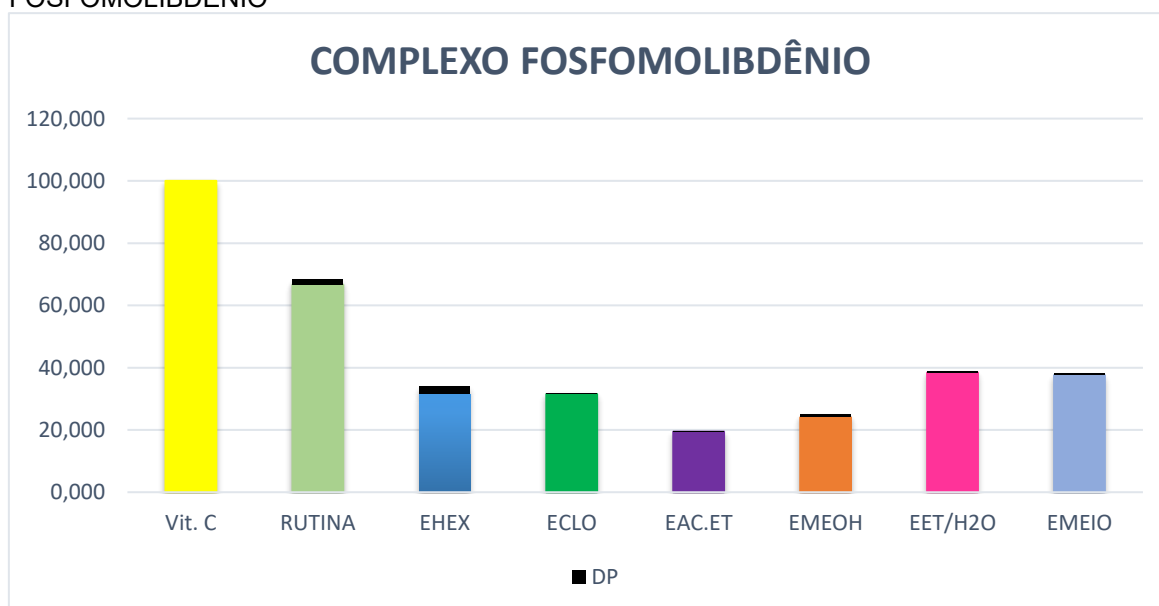
Este ensaio foi realizado para avaliar a atividade de compostos lipofílicos e hidrofílicos (PRIETO, PINEDA e AGUILAR, 1999). Os extratos de *D. pinea* apresentaram atividade antioxidante pela redução do complexo do fosfomolibdênio melhores quando comparadas ao padrão rutina, sendo destacados os extratos hexano, clorofórmio, etanol/água e meio, pois estes apresentaram atividade em torno de 50% quando comparados a rutina.

Considerando a atividade da vitamina C, os valores não foram tão relevantes, pois nenhum extrato alcançou atividade superior a 50% da atividade da vitamina C, sendo assim considera-se uma atividade baixa. Os dados podem ser visualizados na tabela 16 e gráfico 14, respectivamente.

TABELA 16 – ANÁLISE DO FOSFOMOLIBDÊNIO

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VITAMINA C E A RUTINA AA(%) + DP	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE DUNCAN					
VIT C	100,00	a					
RUT	66,67 \pm 1,62		b				
EHEX	31,53 \pm 2,33				d		
ECLO	31,53 \pm 0,29				d		
EAC.ET	19,46 \pm 0,22						f
EET/H ₂ O	24,03 \pm 0,94					e	
EMEIOH	39,41 \pm 0,58			c			
EMEIO	37,61 \pm 0,51			c			

NOTA: AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE
 FONTE: O autor (2017)

GRÁFICO 14 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *D. pinea* PELO MÉTODO DO FOSFOMOLIBDÊNIO

FONTE: O autor (2017)

Pesquisas voltadas para área sobre antioxidantes e radicais livres têm aumentado muito nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com determinadas patologias, levou à incansável busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células vivas (ALVES et al., 2010). Como antioxidantes já conhecidos e de origem natural pode-se citar o ácido gálico e a quercetina, que possuem uma cinética de ação rápida e

hidrofílico e lipofílico, respectivamente (ALVES et al., 2010).

Os antioxidantes apresentam fontes de substâncias com elevado potencial terapêutico e aplicabilidade na área humana. São muito difundidos em todo o mundo em produtos nutracêuticos e medicamentos, sendo responsáveis por ações como melhora da imunidade, atividade antiinflamatória, melhora de cognição, entre outros.

5. CONCLUSÃO

Na determinação das melhores condições de cultivo o meio batata dextrose apresentou superioridade quando comparado com os meios Czapek e malte para os três fungos. Quanto a melhor temperatura de crescimento esta foi definida em 12 °C para o *B. cinerea* e 20 °C para a *Armillaria sp.* e o *D. pinea*. Quanto ao tempo de cultivo todos os fungos apresentaram maior produção micelial com tempo superior a 35 dias.

Nas análises de CCDs obteve-se positividade para esteroides e triterpenos, flavonoides, taninos e polifenóis.

Nas análises de CLAE-UV nos extratos fúngicos foram identificados picos que indicam substâncias com características polares e apolares nos cromatogramas dos fungos. Os meios de cultura foram testados isoladamente, sendo excluída a possibilidade de determinadas substâncias serem somente do meio de cultura.

Os testes histoquímicos apresentaram positividade para lignina, polissacarídeos, alcaloides e terpenóides o que pode indicar a presença destas substâncias nas amostras.

As análises físico químicas foram realizadas com o fungo liofilizado, obteve-se um pH de 6,12, 13,9% de proteínas, 27,8% de fibras brutas sendo que este valor alto pode estar ligado à presença de polissacarídeos na amostra, 8,9% de lipídeos e 38,9% de carboidratos. O fungo é inviável para consumo humano, pois apresentou toxicidade nos testes biológicos realizados *in vitro*.

O microorganismo apresentou positividade para quitina, porém esta não foi isolada, diferentemente do exopolissacarídeo que foi precipitado e deve ser identificado e testado em posterior pesquisa.

Quanto aos testes de toxicidade, obteve-se um valor positivo para os extratos do meio, hexano, clorofórmio e acetato de etila. As concentrações de 500 µL e 1000 µL foram as mais tóxicas.

A atividade antimicrobiana foi testada contra cepas de bactérias e fungos de interesse clínico sendo considerada moderada a fraca contra o *E. faecalis* ATCC 29212 para o extrato clorofórmio e inativa para todas as

cepas e extratos.

Quanto à atividade antioxidante esta foi considerada baixa pelo método de redução do DPPH, média a alta na análise de compostos fenólicos totais e moderada comparando-se com o padrão rutina no teste do fosfomolibdênio.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa realizada é inédita apresentando um grande potencial e contribuição para a comunidade científica. É importante para o desenvolvimento de novos produtos com aplicabilidade na saúde humana, animal e indústria agrícola. É possível a realização de outros testes biológicos, farmacologia, isolamento de metabólitos secundários e identificação dos mesmos. A pesquisa deve ser continuada em posteriores trabalhos devendo-se primar pela publicação de todos os dados obtidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2013** - ano base 2012 /ABRAF. Brasília. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF11/ABRAF11EN.pdf> Acesso em: 04/01/2017.

ACUMEDIA - Meio BDA. Disponível em: http://foodsafety.neogen.com/pdf/Acumedia_PI/7149_PT_PI.pdf Acesso em: 11/01/2017

ACUMEDIA - Extrato de Malte. Disponível em: http://foodsafety.neogen.com/pdf/Acumedia_PI/7341_PT_PI.pdf Acesso em: 11/01/2017

AGRIOS, G.G. **Plant Pathology**. Academic Press. 1997.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, INC, New York. 4th ed, 869p. 1996.

ALFENAS, C. A; SANFENTES, E; TEIXEIRA, D. A; MILANI, D. Mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries em estacas e microestacas de Eucalyptus sp., resistência a benomyl e erradicação de inóculo do patógeno com água quente. **Rev. Árv.** Viçosa MG. Vol 23, nº 4. Pg. 497-500. 1999.

ALVES, C. Q; DAVID, J. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. Instituto de Química. Universidade Federal da Bahia. Campus Ondina. **Quim. Nova**. Vol. 33, Nº. 10, pg. 2202-2210. 2010.

AMBRÓSIO, M. M. Q; BUENO, C. J; PADOVANI, C. R; SOUZA, N. L. Sobrevivência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, em microcosmo, simulando solarização com prévia incorporação de materiais orgânicos. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/roggerwins/fungos-fitopatogenicos> Acesso em: 04/01/2017.

ARGENTA, S. C; ARGENTA, L.C; GIACOMELLI, S.R; CEZAROTTO, V.S. Plantas Medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI** Vol.7, nº.12: p.51-60, Maio de 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Arlington: **A.O.A.C.**,1995.

AUER, A. G; SANTOS, A. F. Reconhecimento e Identificação dos Principais Patógenos de Importância Quarentenária Associados a Materiais de Propagação ou Madeira. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Florestas Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Documento 192. 2009.

AUER, A. G; GOMES, N. S. B; GRIGOLETTI, A. J. A Armilarirose em Plantios de Pínus no Brasil. 2004. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103280/1/ArmillariosePlantios0001.pdf> Acesso em: 07/01/2017

AZEVEDO, V. V. C; CHAVES, S. A; BEZERRA, D. C. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais – Universidade Federal de Campina Grande – PB. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. Vol.2.3, pg.27-34.

BADALYANI, S. M; INNOCENTI, G; GARIBYANI, N. G. Antagonistic activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathol. Mediterr.** 41, 200–225. 2002.

BANERJEE, A.; KUNWAR A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of red blood cells. **Chemico-Biological Interactions**. Santa Fe, v. 172. n. 2. p. 134-139, jul. 2008.

BARNETT, H. L., HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. **Minneapolis: Burgess Publishing Company**. 3 ed. 1972. 241p.

BASILIO, P. R. R. C. Caracterização morfofisiológica, patogênica e molecular de isolados de *Diplodia pinea*. Curitiba, 2013. Disponível em: http://www.floresta.ufpr.br/pos-graduacao/defesas/pdf_dr/2013/t339_0381-D.pdf Acesso em: julho de 2015.

BBC - The largest living thing on Earth is a humongous fungus. Disponível em: <http://www.bbc.com/earth/story/20141114-the-biggest-organism-in-the-world> Acesso em: 05/01/2017

BEHLING, E. B; SENDÃO, M. C; FRANCESCATO, H. D. C; ANTUNES, L. M G; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr., Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292. 2004.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 58, p.1-26, 2005.

BERGER, L. R. R. Produção e Caracterização de Quitina e Quitosana por *Rhizopus arrizus* e *Cunninghamella elegans* e Aplicação em Membranas na Remoção de Cádmio. **Universidade Federal de Pernambuco - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**. Recife - PE Dezembro de 2013.

BIHON, W; BURGESS, T; SLIPPERS, B; WINGFIELD, M. J; WINGFIELD, B. D. High levels of genetic diversity and cryptic recombination is widespread in introduced *Diplodia pinea* populations. **Australasian Plant Pathol.** Pg. 41–46. 2012.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Volume 1.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. 2010.

BRIOSO, P. S. T. FUNGOS FITOPATOGENICOS. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Instituto de biologia. Departamento de entomologia e fitopatologia.** Área de fitopatologia. Rio de Janeiro. 2014.

BUENO, C. J; FISCHER, I. H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 3, n.2, Julho/Dezembro de 2006.

CAMPANILE, G; RUSCELLI, A; LUISI, N. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests. **Eur J Plant Pathol** 117:237–246. 2007.

CARDOSO, E. R; ASSIS, L. C; NAHAS, E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. **Summa Phytopathologica.** vol.35 nº.4 Botucatu Oct./Dec. 2009.

CHOW, C. K. S. Penetration of young stems of *Pinus radiata* by *Diplodia pinea*. **Physiological Plant Pathology.** Vol.12, 189-192. 1978.

CLEMENTINO, L. S; ROSADO, F. R. Cultivo submerso de *Ganoderma lucidum* em diferentes meios de cultura. **IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar** 20 a 24 de outubro de 2008.

CORRÊA, P. R. R; AUER, C. G; SANTOS, A. F. *Diplodia pinea* na região Sul do Brasil. **EMBRAPA FLORESTAS** Comunicado 312. 2013

CORRÊA, P. R. R; MACEDO, L. M; AUER, C. G; SANTOS, A. F. Caracterização de isolados de *Diplodia pinea* da região Sul do Brasil por meio da compatibilidade micelial e de marcadores RAPD. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 42, n. 1, p.97-99, 2016.

COSTA, L. B. Efeito da radiação UV-B na interação *Botrytis cinerea* – *Clonostachys rosea* em morangueiro e do ácido 4-aminobenzóico no controle do patógeno em tabaco. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.pg.fca.unesp.br/Teses/PDFs/Arq1143.pdf> Acesso em: julho de 2015.

CUNHA, P. L. R; PAULA, R. C. M; FEITOSA, J. P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química nova.** Vol.32 nº 3, São Paulo. 2009.

DEWIK, P.M. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach.* 2nd ed., Chichester, John Wiley & Sons, 2002.

DING, Z; ZHANG, Z; ZHONG, J; LUO, D; ZHOU, J; YANG, J; XIAO, L; SHU D; TAN H. Comparative transcriptome analysis between an evolved abscisic acid-overproducing mutant *Botrytis cinerea* TBC-A and its ancestral strain *Botrytis cinerea* TBC-6. **Scientific Reports**. 2016.

DUX, J.P; STALZER, R.F. Managing safety in chemical laboratory. **Van Nostrand Reinhold**, New York. 1988.

EFRAIM, P; ALVES, A.B; JARDIM, D.C.P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Braz. J. Food Technol.** Campinas, v. 14, n. 3, p. 181-201, jul./set. 2011 DOI: 10.4260/BJFT2011140300023.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, J. R. V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**, v. 7, p.88–95, 1961.

FALLER, A.L.K; FIALHO, E.. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Rev Saúde Pública**. 43(2):211-8. 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/rsp/v43n2/207.pdf> Acesso em 02/03/2017.

FERDINANDI, D. M; ROSADO, F. R. Produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* (JACQ.FR.) Kummer sob influência do extrato aquoso de *Ginkgo biloba* em diferentes concentrações. **Revista Saúde e Pesquisa**. Vol. 1, nº. 2, pg. 99-102, maio/ago. 2008.

FERREIRA, F. A. Patologia Florestal; principais doenças florestais do Brasil. **Vicosa, Sociedade de investigação florestal**, 1989, 570p.

FIGUEIREDO, A. C. S; BARROSO, J. M. G; PEDRO, L. M. G; ASCENSÃO, L. **Centro de Biotecnologia Vegetal**. Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos. Universidade de Lisboa, 2007.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. **Cambridge University Press**, 3rd Edition, 1971.

FIOCRUZ. Toxicidade. Disponível em: http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/lab_virtual/toxidade.html Acesso em: 10/01/2017

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n.3, p. 291-296, 2005.

FORZZA *et.al.* Catálogo de plantas e fungos do Brasil. **Cip Brasil**. Catalogação na fonte – Sindicato nacional de editores de livros p.714. v.1 Rio de Janeiro 2010.

FOTO ADAPTADA. Fungos Unicelulares. **Só biologia**. Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/biofungos2.php>. Acesso em 20/03/2017.

FREIRE, C. G; MARCHETTI, M. M; OLIVEIRA, L. P. Caracterização nutricional do fungo ectomicorrízico *Lactarius Deliciosus*. **Revista interdisciplinar de estudos em saúde**. 2013.

FURLANII, R. P. Z; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. Vol.64 nº.2, São Paulo. 2005.

FURLANII, R. P. Z; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas, 27(1): pg. 154-157, jan - mar. 2007.

GAVA, M.A. Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos. **Universidade de São Paulo**. Piracicaba, São Paulo, 2002. Disponível em: [file:///C:/Users/paula/Downloads/marcio%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/paula/Downloads/marcio%20(1).pdf). Acesso em 30/03/2017

GOMES, A.C.S. Cinética de crescimento do fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* M. 7.7 em cultivo no estado sólido. **Unesp – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho**. São José do Rio Preto 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/127684/000844224.pdf?sequence=1>. Acesso em 01/04/2017.

HADIBARATA, T; YUSOFF, A. R. M; ARIS, A; KRISTANTI, R. A. Identification of naphthalene metabolism by white rot fungus *Armillaria* sp. F022. **Journal of Environmental Sciences**. 2011.

HAMZA, L. F., KAMAL, S. A., HAMEED, I. H. Determination of metabolites products by *Penicillium expansum* and evaluating antimicrobial activity. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, Vol. 7(9), pp. 194-220, September 2015.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n. 6, p. 985. 1999.

HERNÁNDEZ,S. Informe del experimento sobre como se descubrió la Penicilina. Disponível em: <http://www.monografias.com/trabajos94/informe-del-experimento-como-se-descubrio-penicilina/informe-del-experimento-como-se-descubrio-penicilina.shtml> Acesso em: 05/01/2017.

HIBBETT, D.S, et al. A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi. **Mycological Research** 111: 509-547. 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v. 1, ed. 3, São Paulo: IMESP, 1985.

KAPITOLA, P. Image type Museum. **Central Institute for Supervising and Testing in Agriculture**. 2010.

KASVI – Meios de cultura. Disponível em: <http://www.kasvi.com.br/wp-content/uploads/2015/05/Meios-de-Cultura.pdf> Acesso em: 11/01/2017

KOBORI, H; SEKIYA, A; YASUDA, N; NOGUCHI, K; SUZUKI, T; CHOI, J.H; HIRANI, H; KAWAGISHI, H. Armillariols A to C from the culture broth of *Armillaria* sp. **Tetrahedron Letters**. 2013.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity test. **Alternative Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LINALDEDDU, B. T; HASNAOUI, F. S; FRANCESCHINI, A. First report of shoot blight and dieback caused by *Diplodia pinea* on *Pinus pinaster* and *P. radiata* trees in Tunisia. **Phytopathologia Mediterranea** 47(3). Pg. 258-261. 2008.

LOBATO, R. C; VARGAS, V. S; SILVEIRA, E. S. Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba**, v. 11, n. 2, p. 21 - 28, 2009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCHI, N; PRATES, N; SIMI, L; PAZZAGLI, m; CAPRETTI, p; SCALA, a; SLIPPERS, b; PINZANI, p. High-Resolution Melting Analysis: a new molecular approach for the early detection of *Diplodia pinea* in Austrian pine. **Fungal biology**. Pg.715 e 723. 2011.

MADAR, Z; SOLEL, Z; SZTEJNBERG, A. Phytoalexin production by cypress in response to infection by *Diplodia pinea* f.sp. *cupressi* and its relation to water stress. *Physiological and molecular Plant Pathology*. Vol. 47, pg. 29 – 38. 1995.

MAIA, L. C.; CARVALHO JUNIOR, A. A. Introdução: os fungos do Brasil. In: FORZZA, R. C., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro p. 43-48. Vol. 1, 2010.

MEIO CZAPEK. Disponível em: <http://www.hexasystems.com.br/produto/agar-czapek-dox-frasco-500g.aspx> Acesso em: 11/01/2017

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHEREFF, J.S. “Fungos como agentes de doenças de plantas”. **Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Agronomia – Área de Fitossanidade**. 2013.

MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. **Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR**, Curitiba, 2003.

MUNIZ, G. A. S. Fisiologia dos Bloqueadores Neuromusculares, 2004. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAxAxZ4AB/fisiologia-dos-bloqueadores-neuromusculares> Acesso em: 03/01/2017.

NOSSA CAPA: ALEXANDER FLEMING E A DESCOBERTA DA PENICILINA. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 5, p. I, Oct. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442009000500001> Acesso em: 02/01/2017

OLIVEIRA, C. F. Morfoanatomia, caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Psychotria fractistipula* L.B. Sm., Klein & Delprete (RUBIACEAE). 2015.

OSBORNE, D. R.; VOOGT, P. **The analysis of nutrient in foods**. London: Academic Press, 251 p, 1978.

PINTO, A. C; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V. S; LOPES, N. P; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.

QUEIROZ, G.S. Análise de esteróides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *Brunfelsia uniflora*. Florianópolis, novembro de 2009. **Repositório da Universidade Federal de Santa Catarina**. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/99787/Gustavo.pdf?sequence=1> Acesso em: 25/03/2017.

REGLINSKI, T; TAYLOR, J. T; AH CHEE, A; NORTHCOTT, G; SPIERS, M. Biochemical responses to ultraviolet-C radiation and methyl jasmonate in *Pinus radiata* seedlings that accompany induced resistance to *Diplodia pinea*. **Plant Pathology**. Vol. 62, pg. 851–858. 2013.

RELATÓRIO Nº 27 078 - **Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo** - IPT Sistema de Informações de Madeiras Brasileiras. São Paulo: IPT, 291p. 1989b.

SAMARAS A; MADESIS P; KARAOGLANIDIS G. S. Detection of sdhB Gene Mutations in SDHI-Resistant Isolates of *Botrytis cinerea* Using High Resolution Melting (HRM) Analysis. **Front Microbiol**. Nov, 2016.

SANTINI, E. J; HASELEIN, C. R; GATTO, D. A. Análise comparativa das propriedades físicas e mecânicas da madeira de três coníferas de florestas plantadas. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.10, n.1, p.85-93. 1985.

SCHULTZ, Alarich R. - Botânica Sistemática, Porto Alegre, RS, 1968, Ed. Globo, 3 ed.,p. 427.

SILVA, D. S. M. Determinação de compostos fenólicos por HPLC. **Química Industrial**. Covilhã, 2012.

SILVA, F. B. Caracterização morfológica, fisiológica e patogênica de isolados de *Armillaria* sp. da Região Sul do Brasil. Curitiba, 2014. Disponível em: http://www.floresta.ufpr.br/pos-graduacao/defesas/pdf_dr/2014/t373_0440-D.pdf Acesso em: julho de 2015.

SILVA, L. J. Controle biológico de *Botyitis cinerea* em pós colheita de morango (fragaria x ananassa) por linhagem de *Streptomyces araujoniae* sp. nov. **Universidade de São Paulo – USP**. 2014

SILVA, R. R; COELHO, G. D. Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas. instituto de botânica – **IBT Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente Curso de Capacitação de monitores e educadores**. São Paulo, 2006.

SIMÕES, C.M.O; Schenkel, E.P; Gosmann, G; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editor Da **UFSC**, 1999, 821 pp.

SIMÕES, C.M.O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/ **UFRGS**/ Ed. Da UFSC, 2000.

SIQUEIRA, J. M; BOMM, M. D; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - *Annonaceae*, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia Salina* Leach. DFB - CCBS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Departamento de Química - CCET – **Química nova**, 21(5). 1998.

SHIMIZU, J. Y. *Pinus* na silvicultura brasileira. **Embrapa florestas**. Disponível em: http://ambientes.ambientebrasil.com.br/florestal/artigos/pinus_na_silvicultura_brasileira.html Acesso em: agosto de 2015.

SHIMIZU, J.Y. *Pinus* na silvicultura brasileira. **Embrapa florestas**, 2008. Disponível em: <http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00083142.pdf> Acesso em: 15/03/2017.

SHIMIZU, J.Y.; MEDRADO, M.J.S. Cultivo do *Pinus*. **Sistemas de Produção Embrapa Florestas**, n.5, p.1-18, 2005.

SOUSA, A. S; RODRIGUES, N. C; NASCIMENTO, J. P. L; CASTRO, C. F. S; SOUCHIE, E. L; DYSZY, F. Determinação de pH e temperatura para atividade celulolítica total máxima e quantificação de etanol do isolado fúngico FLQT7-1. **Anais do V Congresso Estadual de Iniciação Científica e Tecnológica.** Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/ceict/35670-determinacao-de-ph-e-temperatura-para-atividade-celulolitica-total-maxima-e-quantificacao-de-etanol-do-isolado-fungico-flqt7-1> Acesso em: 10/01/2017

SOUZA, V. C; SILVA, R. A; CARDOSO, G. D; BARRETO, A. F. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** vol.10 nº3 Campina Grande Julho/Setembro de 2006.

SP LABOR – Meios de cultura: identificação e cultivo de microorganismos – Disponível em: <http://www.splabor.com.br/blog/meio-de-cultura-2/meio-de-cultura-identificacao-e-cultivo-de-microorganismos/#more-2424> Acesso em: 11/01/2017

STANOSZ, G; DAUGHTREY, M. Photos *Diplodia pinea*. **Diseases of Woody Ornamentals and Trees.** 2011.

TONIAL, F. Bioprospecção de metabólitos secundários de endófitos de *Schinus terebinthifolius*. 2014. 90 p. **Tese de Doutorado (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <<http://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/37263>>. Acesso em: 04/04/2015.

UFRJS - CRESCIMENTO DOS MICROORGANISMOS. Disponível em: http://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/fermentacao/fer_crescimento02.htm Acesso em: 07/01/2017

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; et al. em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria* Artigo. v. 16, n. 2, p. 216–223, 2006.

VIEGAS, C. J; BARREIRO, V. S. E. J. Química Medicinal Moderna. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, Vol. 29, Nº. 2, 326-337, 2006.

WADA, K; ISHIDA, T. A new pentaketide, diplodialide-D, from *Diplodia pinea*. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** Pg. 340-341. 1976.

WADA, K; ISHIDA, T. A steroid hydroxylase inhibitor, diplodialide-A, and related metabolites from *Diplodia pinea*. **J. Chem. Soc., Perkin Trans.** Pg. 1154-1158. 1979.

WAGNER, H.; Plant Drugs analysis. 2º ed. Berlin: Springer, p. 298-299 e 319-319, 1996.

WHO. 1981a. Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Geneva.

8. ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
HERBÁRIO UNOP



Cascavel, PR, Brasil, Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário, CEP 85819-110, Tel. 45 32205239

Data do envio / Sent date: 14/08/2015

Herbário UNOP *Algae* - 09/2015

RECEBIDO DE UFPR

Marilis Dallarmi Miguel
Universidade Federal do Paraná
Campus III
CEP 80210-170

Finalidade do envio/Purpose:


- ☒ Doação/Gift para recebimento do VOUCHER
- ☐ Permuta/Exchange
- ☐ Devolução/Return
- ☐ Empréstimo/Loan por/for 6meses/months
- ☐ Prorrogação/Prorogation
- ☐ Para identificação/For identification

Material recebido:

05 amostras secas para Herbário UNOP *Algae*:

- UNOP 4240 *Armillaria* sp.
- UNOP 4241 *Botrytis cinerea*
- UNOP 4242 *Diplodia pinea*
- UNOP 4243 *Rhizoctonia* sp.
- UNOP 4244 *Scleroderma* sp.
- UNOP 4245 *Suillus granulatus*

Remetido por/from:


Prof^a Dr^a Norma Catarina Bueno
Curator Herbario UNOP *Algae*
UNIOESTE/CCBS

Favor datar, assinar e devolver uma cópia desta guia de remessa/Please sign, date, and return one copy.
Recebido em/ Assinatura/Date received:

Signature: